



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD
GENÉTICA INDIVIDUAL A CÁNCER PULMONAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

M. en C. REBECA PÉREZ MORALES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología apoyo el presente trabajo, a través del proyecto N. 46341-M “Estimación de la dosis interna de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en habitantes de la ciudad de México y su relación con los polimorfismos metabólicos de CYP1A1*2A, CYP1A1*2C y GSTM1*0” También otorgo una beca CVU 204279 para la realización de estudios de posgrado.

El Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica otorgo un apoyo financiero (PAPIIT IN219807-3), para la realización del proyecto “Identificación de marcadores de susceptibilidad genética individual a cáncer pulmonar”

La Universidad Nacional Autónoma de México otorgo una beca de movilidad estudiantil, a través del programa Movilidad de Estudiantes y el Convenio de Cooperación entre México (UNAM) – España (USAL), para la realización de un estancia de investigación en el Centro de Investigación del Cáncer en Salamanca, España.

El proyecto *“Identificación de marcadores de susceptibilidad genética individual a cáncer pulmonar”* se realizó bajo la asesoría del siguiente Comité Tutorial:

Dra. Julieta Rubio Lightbourn

Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

Dr. Ignacio Méndez Ramírez

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Julieta Rubio Lightbourn y la asesoría técnica de la M. en IIB Clementina Castro Hernández y el Dr. Pavel Petrosyan.

Dedicatoria

A la luz de mi vida:

Mis hijos Andrea Camila y Juan Daniel

Mi esposo Alberto

Mi mamá Estela

Por llenar mi vida de amor, de pasión y de
confianza

Agradecimientos

A nuestra increíble institución, la UNAM, por todas sus bondades.....por darme lo mejor que tengo en la vida: La culminación de mi vida personal y académica.

A mis hijos Andrea Camila y Juan Daniel porque llenan mi vida de motivos para sonreír cada día, porque con ellos he aprendido a ver la vida de diferente manera y porque me han permitido conjuntar los logros sentimentales y académicos.

A mi esposo Alberto porque es un compañero excepcional y juntos hemos aprendido el significado de las palabras amor, pasión, confianza, paciencia y perseverancia..... Gracias amor por todos estos años, por nuestros hijos y por nuestra vida, que es como siempre la quise.

A mis padres Estela y Antonio, a mis hermanas Ana y Lupe, y a mis hermanos Roberto y Javier porque siempre me han apoyado en las decisiones importantes.

A la Dra. Julieta Rubio por la dirección de esta tesis, por compartir tantas cosas.....no sólo académicas, gracias por las enseñanzas de vida, el cariño y la paciencia. Gracias por adoptarme como tu hija académica.

A la M. IIB. Clementina Castro porque siempre ha estado dispuesta a escuchar y ayudar incondicionalmente, por compartirme sus conocimientos y su amistad. Gracias Clemen por ser un ejemplo extraordinario de sabiduría y humildad.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt, por todos los comentarios que fueron muy importantes en el desarrollo de esta tesis.

A los miembros del Comité tutorial, al Dr. Ignacio Méndez porque me brindó más que sus conocimientos y al Dr. Rolando Hernández por sus valiosos comentarios durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. José Sullivan y la Dra. Regina Montero porque siempre estuvieron dispuestos a asesorar el trabajo de investigación, han sido una parte muy importante en mi formación académica desde la maestría.

A la Dra. Hortensia Moreno por el tiempo dedicado a la realización de los análisis estadísticos, por compartir conmigo sus conocimientos y por brindarme su amistad.

Al Dr. Pavel Petrosyan por su ayuda técnica y sus comentarios críticos durante la realización de esta tesis.

A la pasante de QFB. Miriam Balderas Morales porque siempre estuvo en la mejor disposición de ayudar y aprender, porque gracias a su esmero y paciencia logró convencer a los pacientes para participar en el estudio.

Al Dr. Angel Daniel Mendoza Posadas oncólogo del INER, porque demostró genuino interés en la realización de esta tesis y por compartir sus experiencias académicas, profesionales y de vida.

Al Dr. Jorge Morales Fuentes y al Dr. Enrique Guzmán de Alba por su ayuda para la obtención de muestras de pacientes, por el acceso a la información y por sus enseñanzas en el área de diagnóstico clínico.

A las instituciones que nos apoyaron en la obtención de diversos recursos, UNAM, IIB, SSA, IMSS, ISSSTE, INER.

A los estudiantes que participaron en la obtención y procesamiento de las muestras de población mexicana abierta.

A los compañeros del laboratorio, Celeste, Alan, Cesar, Wendy, Danny, Nydia, Miriam, Luca, a los que ya no están Karla, Carla, Jorge, Roxana, Valeria, Alicia, Manuel, Mariana, Elsa y Luis Rael, porque hacen más agradable cada día de trabajo en el laboratorio..... gracias por sus aportaciones en los seminarios.

A los amigos de siempre.....para aquellos que aunque no vemos seguido sabemos que siempre estarán ahí: Elizabeth, Isabel, Lucy, Alfredo y Nancy.

INDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	13
1.1. El cáncer	13
1.2. Factores importantes en el desarrollo del cáncer	15
1.2.1. Edad, etnia, dieta y estado nutricional como factores de riesgo a cáncer	16
1.2.2. Exposición a compuestos mutágenos y/o carcinógenos	17
1.2.3. Susceptibilidad genética individual	18
1.3. Biomarcadores importantes en cáncer	21
1.4. Epidemiología del cáncer	22
1.5. Cáncer pulmonar	24
1.5.1. Factores de riesgo en cáncer pulmonar	25
1.5.2. Susceptibilidad genética a cáncer pulmonar	26
1.5.3. Epidemiología molecular del cáncer pulmonar	28
1.5.4. Genes candidatos de susceptibilidad genética a cáncer pulmonar	32
1.5.4.1. Receptor de arilos (AhR)	33
1.5.4.2. Citocromo P450 1A1 (CYP1A1)	34
1.5.4.3. Citocromo P450 2E1 (CYP2E1)	35
1.5.4.4. Epóxido hidrolasa (mEH)	36
1.5.4.5. Glutación transferasas (GST)	37
1.5.4.6. X-ray repair cross – complementing group 1 (XRCC1)	40
1.5.4.7. Excisión repair cross – complementing group 2 (ERCC2)	41
1.5.4.8. O ⁶ – metilguanina – DNA metiltransferasa (MGMT)	41
1.5.4.9. Ciclina D1 (CCND1)	43
1.5.4.10. Proteína supresora de tumores (p53)	44
CAPÍTULO II	
2.1 Justificación	46
2.2. Diseño del estudio	47
2.3. Hipótesis	49
2.4. Objetivos	49
CAPÍTULO III	
3. Materiales y métodos	50
3.1. Sujetos	50
3.2. Análisis de los polimorfismos	50
3.3. Análisis estadístico	54
3.4. Análisis <i>in vitro</i> del daño genotóxico por NNK y B[a]P en linfocitos humanos	55
3.5. Expresión de genes por RT-PCR	56
CAPÍTULO IV	
4. Resultados y discusión	57

4.1. Estudio de casos y controles	58
4.2. Análisis de las frecuencias genotípicas	61
4.3. Genotipos de susceptibilidad genética en población mexicana	62
4.4. Análisis multidimensional del riesgo a cáncer pulmonar	67
4.5. Análisis estratificado por tipo histológico de cáncer pulmonar	70
4.6. Modelo poligénico-aditivo del cáncer pulmonar	73
4.7. Modelo predictivo de regresión logística	76
4.8. Análisis de expresión génica en respuesta a NNK y B[a]P	79
CAPITULO V	
5.1 Conclusiones	81
5.2 Perspectivas	85
ANEXO I. Codificación de matrices	87
ANEXO II. Documento probatorio del Comité Ética	88
Bibliografía	89

Resumen

El cáncer pulmonar (CaP) es la primera causa de mortalidad por cáncer en México y el mundo. En la década pasada hubo un incremento en el número de casos en población joven (< 50 años), lo cual sugiere la importancia de los antecedentes genéticos en la etiología de esta enfermedad. En este estudio, caracterizamos genéticamente 16 polimorfismos en 12 genes de baja penetrancia, que en otras poblaciones han sido asociados con riesgo de padecer CaP, (*AhR*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTPI*, *XRCC1*, *ERCC2*, *MGMT*, *CCND1* and *TP53*) en 382 mestizos mexicanos sanos; como el primer paso en la elucidación de la estructura genética de esta población y en la identificación de individuos de alto riesgo genético a padecer CaP. Todos los genotipos analizados se encontraron bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg y los polimorfismos de los genes *CYP1A1* y *EPHX1* presentan diferentes grados de ligamiento.

La variabilidad genética de esta población fue agrupada en seis clusters definidos con base en sus características genéticas. Utilizamos el modelo poligénico del cáncer para probar el efecto aditivo de los alelos de riesgo en genes de baja penetrancia, e identificamos combinaciones de genotipos de riesgo que podrían determinar la predisposición genética hacia el CaP. La estimación teórica del nivel de susceptibilidad genética mostró que el valor de riesgo individual (VRG) se encuentra en el rango de 1 a 16, sugiriendo que un alto valor de VRG podría ser indicativo de alta susceptibilidad a CaP. Para probar la hipótesis anterior se diseñó un estudio de casos y controles, en el que encontramos que los polimorfismos en los genes *AhR Arg554Lys*, *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C*, *CYP2E1*5B*, involucrados en el metabolismo primario de xenobióticos, *EPHX1 Tyr113His* del metabolismo secundario y *CCND1 G870A* del ciclo celular tienen un efecto protector en la muestra de población mestiza mexicana estudiada.

En el modelo poligénico se observó que existen diferencias significativas entre el VRG de casos y controles (Mann-Whitney = 15,024, $p = 0.004$), lo que apoya la hipótesis del modelo aditivo de polimorfismos en genes de baja penetrancia, en el riesgo de padecer CaP.

El modelo de regresión logística mostró que la susceptibilidad genética es distinta entre hombres y mujeres y que la interacción genes-ambiente es muy importante en el riesgo de desarrollar CaP.

Abstract

Lung cancer (LC) is the leading cause of cancer mortality in Mexico and worldwide. In the past decade there has been an increase in the number of LC cases in young people (>50 years), which suggests an important role for genetic background in the etiology of this disease. In this study, we genetically characterized 16 polymorphisms in 12 low penetrance genes, that in other populations have been associated to risk of LC, (*AhR*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTPI*, *XRCC1*, *ERCC2*, *MGMT*, *CCND1* and *TP53*) in 382 healthy Mexican Mestizos, as the first step in elucidating the genetic structure of this population and identifying individuals in high risk to LC. All the analyzed genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium, but different degrees of linkage were observed for polymorphisms in the *CYP1A1* and *EPHX1* genes.

The genetic variability of this population was distributed in six clusters according to their genetic characteristics. The use of a polygenic model to assess the additive effect of low penetrance risk alleles identified combinations of risk genotypes that could be useful in predicting a predisposition to LC. Estimation of the level of genetic susceptibility showed that the individual calculated risk value (VRGs) ranged from 1 to 16, with higher VRGs indicating a greater genetic susceptibility to LC. To test the above hypothesis we designed a case-control analysis and found that polymorphisms in genes *AhR* Arg554Lys, *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* and *CYP2E1*5B* of primary metabolism of xenobiotic, *EPHX1Tyr113His* of secondary metabolism and *CCND1G870A* of cell cycle have a protective effect in our studied sample of Mexican Mestizo population. The polygenic model showed significant differences between the VRGs of cases and controls (Mann-Whitney = 15.024, $p = 0.004$), supporting the hypothesis of additive model of polymorphisms in low penetrance genes, in the increase of risk to LC. The logistic regression model showed that genetic susceptibility is different

between men and women and that the gene-environment interaction is very important in the risk of developing LC.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER

El cáncer es definido como la división anormal de las células causada por múltiples cambios en la expresión génica, que conduce a la desregulación del ciclo celular y a la invasión de las células hacia nuevos órganos y tejidos (Pecorino, 2008). Existen dos tipos de cáncer: el benigno que se encuentra envuelto en una membrana y puede ser extraído quirúrgicamente, y el maligno que es capaz de infiltrarse hacia los nódulos linfáticos y migrar a distintos órganos del cuerpo (Ruddon, 2007).

Clínicamente el cáncer puede manifestarse como enfermedades diferentes con síntomas y características fenotípicas distintas, esto es debido a la progresión, la competencia celular y a la deriva génica en las poblaciones de células cancerosas, razón por la cual son altamente heterogéneas. Entre las características distintas que puede presentar un tumor se encuentran la capacidad antigénica, la invasividad, el potencial metastático, la tasa de proliferación, el estado de diferenciación y la respuesta a la terapia (Ruddon, 2007).

A nivel molecular todos los cánceres tienen características en común como las mutaciones en proto-oncogenes y en genes supresores de tumores, cuya activación o inactivación están directamente relacionadas con la transformación celular. La mayoría de estos genes se encuentran involucrados en rutas de señalización que controlan el ciclo celular, la diferenciación celular, la integridad del genoma y la apoptosis (Kopnin, 2000).

El modelo propuesto para el proceso carcinogénico incluye tres etapas: *la iniciación, la promoción y la progresión* (Anisimov, 2007).

La iniciación es el primer paso en el desarrollo del cáncer, los iniciadores son agentes que pueden alterar la secuencia del DNA causando mutaciones irreversibles que permanecen en la célula y son transmitidas a las células hijas a través de la división celular. Los agentes iniciadores pueden ser compuestos químicos, físicos o biológicos; entre los compuestos químicos la International Agency for Research of Cancer (IARC) ha reconocido diversos componentes que son considerados

carcinogénicos para animales y humanos, algunos de ellos son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), las dioxinas, las nitrosaminas, compuestos naturales como la aflatoxina B1 y compuestos inorgánicos como el arsénico, asbesto, cromo, por mencionar algunos (www.iarc.fr). Entre los agentes físicos se encuentran la radiación ionizante, como los rayos X, los ultravioleta y los gamma, y la energía radiante. Ambos componentes (químicos y físicos) pueden iniciar a las células debido al estrés oxidante que genera radicales libres capaces de unirse covalentemente con el DNA formando aductos y favoreciendo así la generación de mutaciones, o causando mutaciones a través de la reparación de los dímeros de timina, causados por rupturas en la cadena de DNA. Entre los iniciadores biológicos se encuentran agentes como el virus del papiloma humano (HPV), el virus de la hepatitis B y C (HVB, HVC), el virus Epstein Barr (EBV), el virus de inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), entre otros; además de bacterias como *Helicobacter pylori* y algunos parásitos helmintos como *Opisthorchis viverrini* y *Schistosoma haematobium* (Herrera y cols., 2005); estos agentes biológicos pueden iniciar a las células a través de diversos mecanismos como la generación de radicales libres causados por la inflamación crónica y por la inserción de secuencias en el DNA del hospedero.

La promoción es un proceso gradual que requiere la exposición de las células iniciadas a agentes promotores. Estos agentes promueven la proliferación de las células dando lugar a un gran número de células hijas que son portadoras de las mutaciones de las células iniciadas, a este proceso se le conoce como expansión clonal. Los agentes promotores se unen a receptores celulares que desencadenan cascadas de señalización promoviendo la proliferación celular. Existen dos clases de promotores: los específicos que interactúan con receptores y actúan sobre células blanco definidas por el tejido y los inespecíficos que alteran la expresión génica sin la presencia de un receptor (Baida, 2006). En esta etapa de promoción puede formarse un tumor benigno que debido a sus características puede ser removido quirúrgicamente.

La progresión implica la conversión de células pre-malignas a células malignas por la adquisición de nuevas mutaciones que pueden ocurrir espontáneamente debido a la inestabilidad genómica propia de la célula, o puede ser acelerada por la exposición de las células transformadas a elementos genotóxicos. La progresión frecuentemente está asociada con un cambio cariotípico, como el aumento de aneuploidias y poliploidias que favorecen la inestabilidad genómica generalizada (Salamanca, 1995), también se incrementa la tasa de crecimiento y se alteran la bioquímica y la

morfología celular. En esta etapa ocurren la vascularización del tumor y una serie de cambios que permitirán la metástasis de las células tumorales; el tumor es clínicamente detectable debido a los síntomas causados por las alteraciones específicas de cada tipo de cáncer (Ruddon, 2007).

1.2. FACTORES IMPORTANTES EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER

La mayoría de los cánceres son de origen multifactorial y se ha establecido que la etnia, la edad, la dieta, el estado nutricional, la exposición a mutágenos y/o a carcinógenos, y la susceptibilidad genética individual son factores que pueden conducir a la transformación neoplásica (Fig. 1.1).

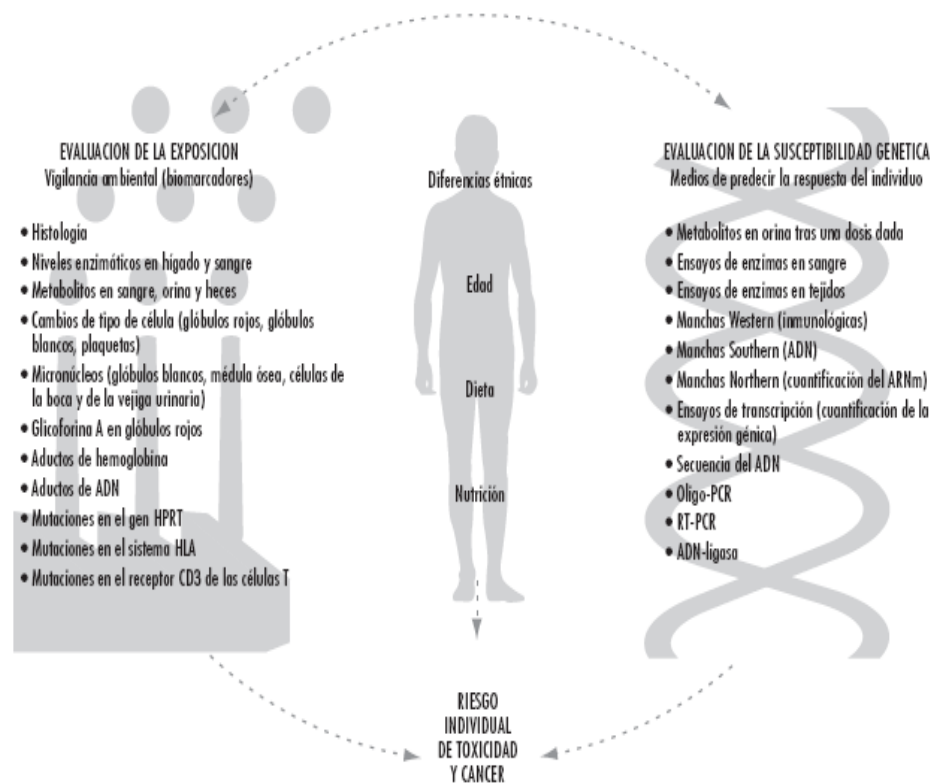


Fig. 1.1. Factores importantes en el desarrollo del cáncer. Tomado de Nebert and McKimmon, 2006.

1.2.1. Edad, etnia, dieta y estado nutricional como factores de riesgo de cáncer

La edad es un factor de riesgo muy importante para el desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer, las estadísticas de la OMS y la SSA muestran que hay una mayor incidencia de casos de cáncer en individuos mayores de 60 años, este aumento ha sido atribuido a cambios bioquímicos y metabólicos que sufren las células al envejecer, este desbalance homeostático genera cambios irreversibles que afectan las células, tejidos y órganos, aumentando así la vulnerabilidad de los individuos de edad avanzada hacia el desarrollo del cáncer (Anisimov, 2007).

Por otro lado, la etnia también juega un papel muy importante en el desarrollo de algunos tipos de cáncer, como los de mama, colon, estómago, piel, entre otros. Por ejemplo, las poblaciones caucásicas son más susceptibles de padecer cáncer de piel que las poblaciones africanas, debido a que estas últimas presentan una coloración de piel más oscura; además un factor adicional es la exposición solar, por lo que individuos caucásicos que viven en sitios muy expuestos a radiaciones solares tiene un riesgo más alto de desarrollar cáncer de piel, como es el caso de las poblaciones australianas (Green y Battistutta, 1990).

Además de la edad y la etnia, la OMS ha estimado que la dieta y la nutrición son determinantes muy importantes en las enfermedades crónico-degenerativas como el cáncer. Mientras que la edad, el sexo y la susceptibilidad genética son factores que no podemos modificar, la dieta y la nutrición son factores que sí podemos controlar; no obstante los cambios en los regímenes alimenticios y en el estilo de vida, son una respuesta a la industrialización, la urbanización, el desarrollo económico, y la globalización de los mercados; factores que están teniendo grandes repercusiones en la salud humana y en el estado nutricional de las poblaciones, sobre todo en los países en desarrollo y de transición (Reporte OMS, 2000). Se ha estimado que la incidencia de enfermedades crónicas degenerativas ha aumentado de forma muy importante en los países industrializados, en los países en vías de desarrollo y en los países extremadamente pobres, siendo estas últimas poblaciones las más vulnerables, ya que aunado a la hambruna y a la desnutrición, los escasos hábitos de higiene y la falta de servicios de salud agravan su situación.

1.2.2. Exposición a compuestos mutágenos y/o carcinógenos

Diariamente nos encontramos expuestos a compuestos como los HAP, las nitrosaminas, las aminas aromáticas (AA), las aminas heterocíclicas, las dioxinas, etc, que se encuentran en el aire urbano como producto de la combustión incompleta de algunos energéticos. En otros casos existe otro tipo de exposición adicional, como es la laboral, en la que los individuos se encuentran sometidos a concentraciones más altas de ciertos compuestos tóxicos que son característicos de su lugar de trabajo.

Entre los compuestos que han sido reconocidos por su poder carcinogénico se encuentran HAPs como el naftaleno, el antraceno, el fenantreno, el naftaceno, el benzo[a]antraceno, el dibenzo [a,h] antraceno y el benzo [a] pireno, por mencionar algunos (Dickinson, 1992). Los HAPs son generados por la combustión incompleta de diversas fuentes energéticas como el carbón, gas, petróleo, madera, etc, estos productos son liberados al medio ambiente en forma de desechos industriales o incluso en derrames que contaminan el aire, el suelo y/o el agua, constituyendo así un serio problema de salud pública que se ha visto reflejado en el incremento de la morbi-mortalidad causada por diversas enfermedades asociadas a la contaminación. Además, entre los HAP y sus metabolitos se encuentran compuestos muy reactivos que pueden ser tóxicos, mutágenos y/o carcinógenos capaces de interactuar con el DNA formando enlaces covalentes, entre ellos los aductos que causan mutaciones irreversibles y que pueden conducir al desarrollo del cáncer (Alexandrov y cols., 2002, Meléndez y cols., 1999).

Otros carcinógenos importantes son las nitrosaminas, las aminas aromáticas (AA) y las aminas heterocíclicas, que se encuentran presentes en el humo del tabaco y en productos químicos utilizados en algunas industrias de plásticos, pesticidas, cosméticos, etc, (Scalan, 2006, Pfau y cols., 1999). Por otro lado, las dioxinas pertenecen al grupo genérico de los organoclorados que comprenden alrededor de 11.000 compuestos, éstos son muy estables y presentan una elevada liposolubilidad lo cual facilita su bioacumulación. Se originan de modo habitual en la incineración de los residuos urbanos y hospitalarios, en la fabricación de papel, en la industria del cemento, en la fabricación de herbicidas y en la fabricación del cloruro de polivinilo (PVC), también se generan durante los procesos de combustión del caucho y de los productos petrolíferos. La dioxina más

conocida es la 2,3,7,8 - tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) la cual muestra una elevada tasa de absorción, por lo que la exposición ya sea por vía oral, nasofaríngea, pulmonar o placentaria, conduce a intoxicaciones en el ser humano, además se transfieren a través de la leche materna durante la lactancia y también se ha reportado que la exposición a elevadas dosis se asocia con un incremento del 40% en el riesgo relativo de padecer algún tipo de cáncer (Costopoulou y cols., 2006, Mandal, 2005).

En los últimos años se ha incrementado de manera importante la contaminación ambiental y se han descrito diversas fuentes de contaminación en zonas urbanas, industriales y rurales. En la primera, el tránsito vehicular es la principal fuente de contaminación; en la segunda, los desechos generados por la actividad industrial y en la tercera, la quema de materiales energéticos como madera, carbón y aceites. También se han reportado variaciones en la cantidad y composición de las emisiones contaminantes según el estado meteorológico, principalmente en las estaciones de verano e invierno (Dagher y cols., 2006, García-Suastegui y cols, 2011).

1.2.3. Susceptibilidad genética individual

Actualmente se ha reconocido la importancia de los factores genéticos de susceptibilidad que aumentan el riesgo de padecer cáncer. Se ha observado un incremento en la frecuencia de enfermedades genéticas raras y en la predisposición a padecerlas si se pertenece a la misma familia y más aún si se es portador de la mutación responsable de la enfermedad. Por ejemplo, se ha determinado que la presencia de una enfermedad genética rara puede aumentar el riesgo de desarrollar cierto tipo de cánceres, que en la población general tienen una frecuencia muy baja, como es el caso de la ataxia telangiectasia cuyos individuos afectados presentan un 60% de probabilidad de desarrollar linfoma y 27% de probabilidad de sufrir leucemia (Pecorino, 2008).

Por otro lado, se ha estimado que los familiares de un paciente con cáncer tienen una mayor probabilidad de desarrollar el mismo tipo de cáncer, o algún otro, debido a la carga genética. Además, se han documentado casos familiares de cánceres de colon y de mama, principalmente, en los que la presencia de mutaciones específicas son determinantes en el desarrollo del cáncer (Yu y

cols., 2003). Todas estas evidencias confirman la existencia de la susceptibilidad genética al cáncer, sin embargo, no todos los tipos de cáncer tienen una relación directa con mutaciones específicas, por lo que definir la contribución exacta de los factores genéticos en la susceptibilidad al cáncer ha sido muy difícil. Gracias a los estudios acerca del papel que desempeñan los genes de alta penetrancia y los de baja penetrancia se han logrado avances significativos en el entendimiento de la genética del cáncer.

Los genes de alta penetrancia tienen una frecuencia relativa baja, se encuentran relacionados en el 5-10% de los casos de cáncer (Houlston y Peto, 2004). Estos genes fueron identificados en enfermedades autosómicas dominantes mediante análisis de ligamiento y de clonación posicional realizados en familias completas (Suh y Vijg, 2005). Estos genes presentaban alelos mutados que al ser heredados aumentaban considerablemente la susceptibilidad al cáncer, estos hallazgos han sido muy importantes para establecer numerosos aspectos de su biología. Algunos ejemplos de genes de alta penetrancia en cáncer son; *BRCA1* y *BRCA2* en cáncer de mama y ovario, *RB* en retinoblastoma, *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS1* y *PMS2* en cáncer de colon hereditario no polipósico (Balmain, 2003).

Como se mencionó anteriormente, los genes de alta penetrancia tienen una baja frecuencia en la población general y no explican todos los casos de cáncer presentes actualmente, es por ello que se ha puesto gran énfasis en la identificación y el estudio de genes de baja penetrancia implicados en el desarrollo del cáncer. Los genes de baja penetrancia corresponden a genes que codifican proteínas que juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, por ello se les ha denominado *genes candidatos*, estos genes pueden presentar mutaciones que alteran la función de la proteína codificada, ya sea disminuyendo, aumentando o suprimiendo su actividad y/o función. Por lo tanto, existen otras variantes además de las silvestres, a las cuales se les conoce como *variantes polimórficas* y a las mutaciones que las originan *polimorfismos*. Los genes de baja penetrancia tienen una frecuencia más alta en la población general, desde 0 hasta 100% en algunas poblaciones, sin embargo el número de genotipos de riesgo presentes en un individuo son los que determinarían su susceptibilidad al cáncer (Fletcher y Houlston, 2010).

En este contexto, se ha planteado el modelo aditivo (*log additive model*) el cual considera que cada genotipo de riesgo tiene un efecto pequeño y la presencia de más alelos de riesgo, hasta cientos o miles de ellos que van teniendo un efecto aditivo, son los que determinan la susceptibilidad genética al cáncer (Pharoah y cols., 2004), principalmente en los casos de cáncer esporádico.

Como se mencionó anteriormente el cáncer es de origen multifactorial por lo que tanto la exposición ambiental, como los factores genéticos son de suma importancia en su desarrollo (Figura 1.2), para explicar lo anterior se han postulado cuatro modelos básicos para definir la interacción entre los factores genéticos y los factores ambientales (Giarelli y Jacobs 2005).

Susceptibilidad genética

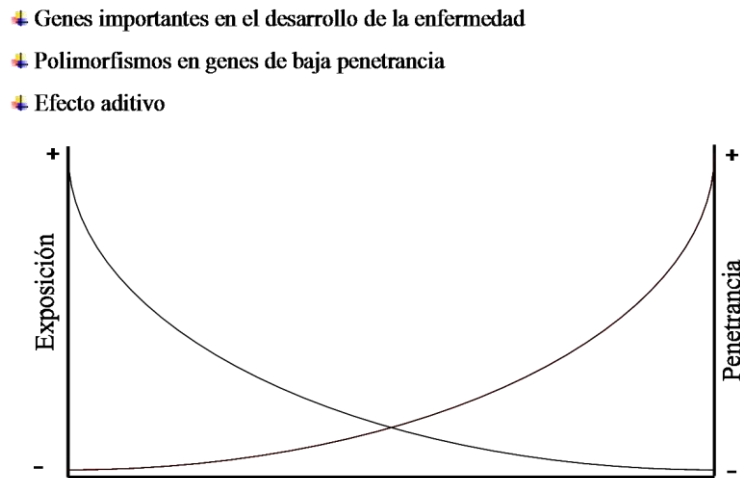


Fig. 1.2. Penetrancia de los genes y su relación con la exposición

1. Ninguno de los factores que actúan de forma independiente determina el riesgo de cáncer, es necesaria la combinación de ambos: factores genéticos y ambientales.
2. La presencia de factores genéticos aumenta el efecto de un factor ambiental de riesgo ya presente.
3. El factor ambiental incrementa el efecto de un factor genético ya presente.
4. Ambos factores influyen en el riesgo de forma independiente, pero el riesgo es mayor si existen ambos simultáneamente.

Actualmente se ha reconocido que ambos factores (genéticos y ambientales) son muy importantes en el desarrollo de cánceres esporádicos, razón por la cual es indispensable considerar ambos en el diseño y análisis de los estudios referentes al cáncer.

1.3. BIOMARCADORES IMPORTANTES EN CÁNCER

Los biomarcadores son unidades moleculares, genéticas, bioquímicas o celulares, capaces de responder a la exposición de un agente de interés. Han sido de gran utilidad en la investigación toxicológica para detectar alteraciones iniciales y la predisposición genética a ciertas enfermedades causadas por la exposición a compuestos genotóxicos. Entre los biomarcadores más utilizados se encuentran los de dosis interna, los de susceptibilidad genética, los de efecto biológico primario y los de estructura-función alterada (Wang y cols., 1997) (Figura 1.3).

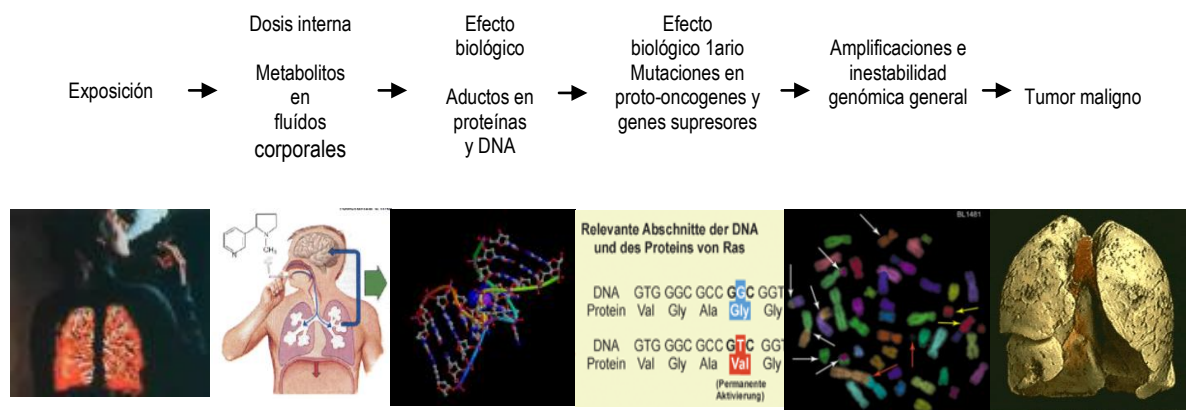


Figura 1.3. Ejemplos de biomarcadores en cáncer pulmonar

Los marcadores de dosis interna miden las concentraciones de compuestos tóxicos absorbidos y distribuidos en el cuerpo a través de sus metabolitos. Por ejemplo, el nivel de cotinina, que es un metabolito de la nicotina, es un buen marcador de dosis interna ya que tiene una vida media larga y refleja la magnitud de la exposición al tabaco, incluso puede detectarse en fumadores pasivos (Wang y cols., 1997).

Los marcadores de susceptibilidad genética incluyen el análisis mutacional de genes importantes en el desarrollo del cáncer, como las mutaciones en el gen *RB* útil en el diagnóstico de retinoblastoma, de *ERCC2* para xeroderma pigmentosa y de *EGFR (Her/2neu)* como factor pronóstico en cáncer de mama, por mencionar algunos ejemplos (Brockmüller y cols., 2000).

Los marcadores de efecto biológico primario incluyen aductos en el DNA y en proteínas, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas y aberraciones cromosómicas (Lodovici y cols., 2004). Los aductos en el DNA resultan de la exposición a compuestos químicos que se intercalan en la doble cadena y aunque un aducto en el DNA puede ser reparado, se ha comprobado que a través de este proceso de reparación se producen mutaciones que pueden conducir al desarrollo carcinogénico (Keteslegers y cols., 2006). Los aductos en proteínas parecen no tener efectos biológicos adversos sin embargo se han utilizado como biomarcadores de la exposición a xenobióticos (Meyer y Bechtold, 1996).

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear que corresponden a material genético no incorporado correctamente a las células hijas durante la mitosis; éstos reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por rupturas de los cromosomas, que son debidas a errores durante la replicación y/o por la exposición a agentes genotóxicos (Salamanca, 1995). Aunque existen factores como la edad, sexo, ingesta de vitaminas, consumo de fármacos, exposición diaria a agentes genotóxicos, etc, capaces de influir o modificar el número de micronúcleos presentes en una célula, actualmente se utilizan los análisis de micronúcleos como biomarcadores de daño genético, debido a la exposición de xenobióticos diversos que tienen un impacto muy importante en la salud humana.

Las aberraciones cromosómicas son cambios numéricos o estructurales en el cariotipo normal de una persona. En lo referente al cáncer, la investigación de las alteraciones cromosómicas ha permitido importantes avances en el entendimiento de la transformación maligna y han conducido al descubrimiento de alteraciones citogenéticas útiles en el diagnóstico y pronóstico de las leucemias, linfomas y tumores sólidos (Salamanca, 1995).

Los marcadores de estructura-función incluyen las alteraciones más frecuentes, como la inestabilidad genómica general a través de la ganancia y pérdida de grandes regiones cromosómicas, aunque éstos ya son considerados como marcadores tumorales y no de susceptibilidad (Walther y cols., 2009).

1.4. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

La epidemiología del cáncer estudia la distribución de las enfermedades neoplásicas en poblaciones específicas, sus etapas precursoras y los principales factores de riesgo, esto con el propósito de lograr una prevención efectiva. Aunque existen diferencias importantes entre los diseños de estudio epidemiológico, en todos los casos se toman en cuenta los siguientes criterios:

- La *fuerza de asociación* de sus estudios o significancia, ya que mientras más fuerte sea la asociación el factor tiene más probabilidades de ser causal.
- La *consistencia*, que significa que la asociación es confirmada en diferentes poblaciones y circunstancias.
- La *especificidad*, que se refiere a que una causa debe de conducir al mismo efecto.
- La *temporalidad*, que se refiere a que la causa debe preceder al efecto.
- La *plausibilidad*, según este criterio la relación causal debe ser coherente con los conocimientos científicos del momento.

Por otro lado, la epidemiología molecular del cáncer ha surgido con el desarrollo de la biología molecular y con la aparición de biomarcadores que permiten identificar biológicamente ciertos fenómenos relacionados con el desarrollo del cáncer. En este contexto, la epidemiología molecular se ha encargado de buscar biomarcadores que puedan predecir la susceptibilidad de ciertos individuos y/o de poblaciones a padecer cáncer (Kiyohara y cols., 2007).

Este trabajo se enfoca en el cáncer pulmonar, por lo que a continuación se hará referencia únicamente a este tipo de cáncer y se tratarán algunos aspectos importantes de su epidemiología molecular.

1.5. EL CÁNCER PULMONAR

El cáncer pulmonar ocupa la primera causa de muerte por cáncer en hombres y la segunda en mujeres, a nivel mundial (Globocan, 2008). Se trata de uno de los cánceres más agresivos y difíciles de tratar ya que no existe un método de diagnóstico eficaz que lo detecte en su fase temprana, y los pacientes suelen acudir al médico en estadios muy avanzados en los cuales ya sólo se les puede ofrecer quimio y/o radioterapia. Una vez iniciado el tratamiento terapéutico sólo un pequeño porcentaje de los pacientes responde al mismo, el resto requiere de varios ciclos y diversas combinaciones de fármacos que intentan combatir la progresión tumoral, sin embargo su eficacia es limitada y trae consecuencias devastadoras en la calidad de vida del paciente (Proctor, 2001).

El 90% de los casos de cáncer pulmonar se atribuyen al tabaquismo, aunque también contribuyen otros contaminantes ambientales y el 10% restante se presenta en individuos en los cuales se cree que los antecedentes genéticos (de alta penetrancia) pueden ser más importantes. La incidencia de casos de cáncer pulmonar en individuos jóvenes (entre 30 y 50 años) han sido relacionados con los antecedentes familiares de cáncer (de alta y baja penetrancia), aunados al estilo de vida (tabaquismo, alcoholismo y estado nutricional) y a la exposición crónica a diversos contaminantes (Taioli y cols., 2003).

En México, se reportó la mortalidad debida al cáncer pulmonar durante el periodo de 1998 a 2002 y se encontró que el 11.45% de las muertes corresponden a neoplasias malignas; además la tendencia revela que las cifras se elevarán cada año (Ruíz-Godoy y cols., 2007). Actualmente el cáncer pulmonar ha sido considerado como un grave problema de salud pública, la OMS estima que en el año 2030 habrán 100 millones de muertes debidas al consumo de tabaco y las predicciones indican que habrá un incremento en la incidencia del cáncer pulmonar, que en parte será atribuida a cambios en el estilo de vida (Xie y Mina, 2008, Proctor, 2001).

En cuanto al tipo histológico, el adenocarcinoma es el más común de todos los tipos de cáncer de pulmón, ya que corresponde al 40-50% de los casos. Se ha diagnosticado tanto en fumadores como en no fumadores y aunque se había sugerido que era el tipo histológico menos relacionado con el consumo de tabaco, éste ha incrementado su frecuencia en mujeres y hombres fumadores. Stellman y cols., (1997) sugieren que algunos cambios en el proceso de fabricación del tabaco pueden ser

responsables de la generación de nuevos componentes que inciden en el desarrollo del cáncer pulmonar y en el tipo histológico.

El segundo tipo histológico más frecuente es el cáncer epidermoide, corresponde al 20–30% de los casos, anteriormente se había sugerido que dicho tipo era el más relacionado con el consumo de tabaco, sin embargo en los últimos años la tendencia ha cambiado (Medina y Salazar, 2002).

El carcinoma de células pequeñas comprende el 10-20% de los casos, es el tercer tipo histológico más frecuente, también se ha relacionado con fumadores y es el más agresivo de todos los tipos de cáncer de pulmón (Wynder y Muscat, 1995).

El carcinoma de células grandes corresponde al 10% de los casos, en esta categoría se incluyen algunos casos que no pueden ser clasificados en los otros tipos histológicos (Wynder y Muscat, 1995).

Otro tipo histológico que ha incrementado su frecuencia es el mesotelioma, aunque éste se ha relacionado con la exposición a asbestos. Neri y cols., (2008) realizaron un estudio en pacientes con mesotelioma y mencionan que los asbestos también pueden ser metabolizados por las mismas enzimas de fase I y II que metabolizan los compuestos del tabaco, por lo que posiblemente las variantes polimórficas de dichas enzimas también podrían incidir en el riesgo de que los fumadores padezcan mesotelioma pulmonar.

1.5.1. Factores de riesgo a cáncer pulmonar

El cáncer pulmonar es atribuido principalmente al tabaquismo, por lo que se han realizado numerosos estudios con respecto al tabaco y a sus derivados metabólicos. La hoja del tabaco contiene, entre otros compuestos, carbohidratos, proteínas, aminoácidos, lípidos, fenoles, ácidos orgánicos, ceras y alcaloides (Valdés y Ayala, 2004), entre estos últimos se encuentra la nicotina que es la que causa la adicción al tabaco. Durante el proceso de combustión se llevan a cabo reacciones químicas que producen cerca de 4000 sustancias que incluyen agentes volátiles como monóxido de carbono, amoníaco, ácido cianhídrico y nitrógeno; entre los compuestos semivolátiles y no volátiles se encuentran la nicotina y el alquitrán que contiene benzo[a]pireno, nitrosaminas y AA que componen la materia particulada del tabaco (Figura 1.4).

Componentes del humo del tabaco	Fumador (S) (20 cig/día)	Fumador pasivo (PS) (8 hrs/día)	Relación de dosis (S/PS)
FASE GASEOSA			
CO (mg)	40-400	14.4-96	2.7-4.2
Formaldehído (mg)	0.4-1.8	0.08-0.4	4-5
Nitrosaminas volátiles (µg)	0.05-1.0	0.03-0.4	1.5-2.5
Benceno (µg)	200-1200	40-400	3-5
MATERIA PARTICULADA			
Partículas (mg)	75-300	0.024-0.24	1250-3000
Nicotina (mg)	7.5-30	0.08-0.4	75-90
Benzo[a]pireno (µg)	0.15-0.75	0.001-0.011	70-150
Cadmio (µg)	1.5	0.001-0.014	110-1500
Nitrosaminas específicas del tabaco (µg)	4.5-45	0.002-0.010	2300-4500

Figura 1.4. Ejemplos de algunos componentes del tabaco y la cantidad consumida según la exposición. Tomado de Chaouachi, 2009.

Entre los compuestos derivados de la combustión del tabaco se encuentra la 4- (metilnitrosamina)-1-(3- piridil) -1- butanona (NNK) que es una nitrosamina específica del tabaco. Hill y cols., (2005) comprobaron el poder genotóxico de dicho compuesto al cultivar linfocitos humanos con varias dosis de NNK, se observó un aumento en el número de aberraciones cromosómicas con un incremento dosis-dependiente. Por otro lado, Abdel-Aziz y cols., (2007) comprobaron que la NNK producía tumores en los pulmones de ratones CD1.

Actualmente existen varias enfermedades que se han relacionado con el consumo del tabaco, entre ellas se encuentran principalmente, los cánceres de pulmón, cavidad oral, faringe, laringe, esófago, páncreas, vejiga y riñón (Reporte IARC, 2008), además de otras enfermedades no neoplásicas como enfermedades cardiovasculares y las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (EPOC) (Wang y cols., 1997). También se ha reportado que la inhalación del humo del tabaco a la que están expuestos los fumadores pasivos es suficiente para que desarrollen alguna de las enfermedades antes mencionadas, esto debido a que se encuentran expuestos a los mismos carcinógenos que los fumadores activos (Reporte IARC, 2002).

Aunque sólo el 10-20% de los fumadores desarrolla cáncer pulmonar, la incidencia de esta neoplasia ha incrementado en individuos menores de 50 años (Gemignani y cols., 2007), lo que pone de manifiesto la importancia de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad. Actualmente se realizan grandes esfuerzos por identificar factores ambientales que aunados a los factores genéticos permitan identificar individuos de alto riesgo a padecer de cáncer pulmonar (Kiyohara y

cols., 2007), esto permitiría prevenir el cáncer o detectarlo en estadios tempranos, lo que traería grandes beneficios en la calidad de vida del paciente y reduciría los costos derivados de la enfermedad tanto para el paciente como para el sector salud.

1.5.2. Susceptibilidad genética a cáncer pulmonar

Aunque se han realizado numerosos estudios con relación a la susceptibilidad genética al cáncer pulmonar pocos han sido los resultados consistentes. Fletcher y Houlston, (2010) hacen una revisión de los genes que han mostrado una relación con el cáncer pulmonar en estudios de asociación de todo el genoma (Genome-Wide Association (GWA)) y mencionan dos locus: uno en el cromosoma 5 y otro en el cromosoma 6, sin embargo estas regiones cromosómicas aún no han sido caracterizadas.

Anteriormente se había identificado por medio de análisis de ligamiento y posteriormente por GWA, un locus en el cromosoma 15q que se encontraba altamente relacionado con el cáncer pulmonar. Más tarde dos grupos de investigación caracterizaron simultáneamente dicha región y encontraron que el locus 15q25 correspondía a tres genes: *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4* (Thorgeirsson y cols., 2008 y Hung y cols., 2008) que corresponden a receptores nicotínicos que se expresan en neuronas, en células epiteliales alveolares, en células neuroendocrinas pulmonares y en líneas celulares de cáncer de pulmón. Estos receptores juegan un papel muy importante en la adicción a la nicotina y su relación con el cáncer pulmonar posiblemente es debida a que los portadores de ciertas variantes alélicas presentan una mayor adicción a la nicotina del tabaco (Le Marchand y cols., 2008), por lo que su relación con el cáncer pulmonar sería indirecta ya que los receptores por sí solos no conducen al desarrollo del cáncer, sino a través de la adicción a la nicotina y son los derivados de la combustión del tabaco los que ejercen el efecto carcinogénico.

Los estudios epidemiológicos acerca de los polimorfismos de los receptores *CHRNA3*, *CHRNA5* y *CHRNA4* fueron consistentes en las distintas poblaciones en las que se analizaron (Thorgeirsson y cols., 2008 y Hung y cols., 2008); dichos estudios sugieren que los portadores de los alelos de riesgo presentan una alta susceptibilidad a desarrollar cáncer pulmonar, cuando son fumadores, ya que

presentan una mayor adicción a la nicotina, por lo que aumentan su consumo de tabaco y por lo tanto el daño generado por los productos de la combustión de éste es mayor.

Como se mencionó anteriormente, la epidemiología molecular del cáncer pulmonar se ha encargado de buscar genes que puedan predecir la susceptibilidad de ciertos individuos y/o de poblaciones a padecer la enfermedad. Principalmente, se han estudiado polimorfismos genéticos en genes blanco que son capaces de modificar la estructura o la función de las proteínas codificadas, lo cual puede favorecer el proceso carcinogénico al aumentar, disminuir o suprimir la función de la variante polimórfica.

1.5.3. Epidemiología molecular del cáncer pulmonar

Se han realizado numerosos estudios de epidemiología molecular en genes candidatos que tienen alguna relación metabólica - funcional con los mecanismos que pueden conducir al desarrollo del cáncer, como es el caso de los genes del metabolismo de xenobióticos (bioactivación, desintoxicación y eliminación), el balance del estrés oxidante, la respuesta inmune (principalmente la inflamación crónica), la reparación del DNA y el control del ciclo celular (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Genes candidatos en cáncer pulmonar

Genes del metabolismo de xenobióticos y el estrés oxidante

Ahr (Receptor de arilos)
CYP1B1 (Citocromo P450 1B1)
CYP1A1 (Citocromo P450 1A1)
CYP1A2 (Citocromo P450 1A2)
CYP2E1 (Citocromo P450 2E1)
CYP2D6 (Citocromo P450 2D6)
GSTM1 (Glutación transferasa M1)
GSTT1 (Glutación transferasa T1)
GTSP1 (Glutación transferasa P1)
NAT (N-acetil transferasa)
EPHX1 (Epóxido hidrolasa)
GPX1 (Glutación peroxidasa)
NQO1 (NADPH quinona deshidrogenasa)
SOD (Super óxido dismutasa)
MDR (Transportador de resistencia a drogas)
MRP1 (Transportador de conjugados con glutación)

Genes de reparación del DNA

XRCC1 (Reparación por complementación)
XRCC3 (Reparación por complementación)
ERCC2 (Reparación por escisión)
ERCC4 (Reparación por escisión)
ERCC5 (Reparación por escisión)
OGG1 (Reparación por escisión)
EXO1 (Helicasa de reparación)
MGMT (Reparación de daño directo)
hMLH1 (Reparación homóloga)

Genes implicados en el ciclo celular

TP53 (Supresor de tumores)
TP27 (Inhibidor de CDK)
TP21 (Oncogen Ras)
RASSF1A (Supresor de tumores RDA32)
GHR (Receptor de la hormona de crecimiento)
EGFR (Receptor del factor de crecimiento epidermal)
EGF (Factor de crecimiento epidermal)
CASP5 (Caspasa 5, proteína apoptosis)
CASP8 (Caspasa 8, proteína de apoptosis)
DR4 (Receptor del factor de necrosis tumoral)
MDM2 (Proteína de unión a p53, inhibidor)
CCND1 (Ciclina D1)
ATM (Check point, unión con p53)

Genes implicados en la respuesta inmune

IL-10 (Interleucina 10)
IL-13 (Interleucina 13)
MMP8 (Metaloproteínasa de matriz)

Existen una gran cantidad de estudios de asociación entre el cáncer pulmonar y los genotipos de enzimas involucradas en la bioactivación de carcinógenos, como los citocromos P450 *CYP1A1* (Shah y cols., 2008), *CYP2E1* (Zhan y cols., 2010), *CYP2D6* (Shaw y cols., 1998); en enzimas de desintoxicación como las glutatión transferasas *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* (Sobti y cols., 2008), N-acetil transferasa -2 (*NAT2*), epóxido hidrolasa (*EPHX1*) (Zhou y cols., 2002); en proteínas implicadas en la reparación del daño al DNA como *XRCC1*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC4*, *MGMT*, *OGG1*, (Zienolddiny y cols., 2006, Hung y cols., 2007); y en genes de proteínas que participan en el ciclo celular y la apoptosis como *CCND1*, *CHEK2*, *MDM2*, *TP53*, *EGF*, (HosgoodIII y cols., 2008), además de genes de la respuesta inmune (Yang y cols., 2010) y genes de proteínas que responden al estrés oxidante (Yang y cols., 2004) (Tabla 1.2). Estos genes se perfilan como *genes candidatos* ya que tienen un impacto en los eventos importantes que pueden alterar la homeostasis celular y conducir al desarrollo carcinogénico.

Algunos de estos polimorfismos han sido extensamente estudiados en poblaciones europeas, asiáticas y norteamericanas, principalmente; sin embargo su relación con la susceptibilidad al cáncer ha sido inconsistente posiblemente debido a que cada población es genéticamente distinta y no se pueden extrapolar los resultados obtenidos en una población a otras poblaciones. Además, la frecuencia de los polimorfismos debe ser estimada de forma adecuada, ya que algunos estudios de asociación fallan al estimar la frecuencia de los polimorfismos en su población control (Taioli y cols., 2004), en la que es muy importante tomar en cuenta la etnicidad y su estratificación, ya que actualmente existen pocas poblaciones homogéneas.

Por ejemplo, el polimorfismo *CYP1A1*2C* se ha asociado con el riesgo de padecer cáncer pulmonar en población asiática: coreana, china y japonesa (Lee y cols., 2008), y en población americana: chilena (Quiñones y cols., 2001) y mexicana (Gallegos-Arreola y cols., 2008), sin embargo en poblaciones caucásicas americanas y europeas no ha sido posible probar esta asociación, quizá porque la frecuencia del polimorfismo es menor al 2% en estas poblaciones (Taioli y cols., 1998).

Por otro lado, el polimorfismo *GSTM1*0* presenta frecuencias entre 0.35-0.58 en poblaciones asiáticas, caucásicas (europeas y americanas) y africanas (Hung y cols., 2003), además ha sido asociado significativamente con el riesgo de padecer cáncer pulmonar en caucásicos (Taioli y cols., 1998), asiáticos (Lee y cols., 2008) y afro-americanos (Mohr y cols., 2003).

Otros polimorfismos como *ERCC2 Asp399Asn*, *ERCC2 Lys751Asn*, *MGMT Leu84Phe*, *MGMT Ile114Val*, no han mostrado asociaciones consistentes entre las distintas poblaciones en las que se han analizado (Kiyohara y cols., 2007^a). Sin embargo, en otro estudio se realizó un meta-análisis de 241 trabajos de casos y controles, en los que se analizan distintos polimorfismos en genes candidatos de reparación del DNA y se encontró suficiente evidencia de que el polimorfismo *XRCC1 Arg399Gln* se encuentra asociado con el riesgo de sufrir de cáncer pulmonar, en varias poblaciones (Vineis y cols., 2009).

Se ha propuesto que la susceptibilidad al cáncer pulmonar puede estar determinada por la presencia de genes de baja penetrancia (bajo riesgo), que tienen una alta frecuencia entre la población general (Kiyohara y cols., 2007^b). En este enfoque es posible que la susceptibilidad al cáncer pulmonar esté

determinada por el número de alelos de riesgo presentes en un individuo, aunque cada alelo confiere un pequeño incremento en el riesgo contribuye sustancialmente al riesgo total en los individuos (Fletcher y cols., 2010). Más recientemente ha surgido la necesidad de abordar la susceptibilidad genética al cáncer como un mecanismo global, por lo que se ha destacado el *modelo poligénico* en el que la susceptibilidad está determinada por alelos de bajo riesgo en múltiples genes candidatos (Pharoah y cols., 2002, Dong y cols., 2008), estos factores genéticos interactúan con factores ambientales dando como resultado el desarrollo del cáncer.

Bajo esta perspectiva sería posible identificar individuos de alto riesgo en la población general, en los cuales sería posible prevenir o detectar el cáncer pulmonar en estadios tempranos, esto reduciría de manera significativa la mortalidad debida a esta neoplasia y los costos financieros que conlleva el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Tabla 1.2. Estudios de asociación entre polimorfismos de genes candidatos y la susceptibilidad a padecer de cáncer pulmonar.

Gen/Polimorfismo	OR	Población	Referencia
Ahr Arg554Lys	3.36	China	Chen D y cols., 2009
CYP1B1 Val132Leu	1.89	India	Shah PP y cols., 2008 ^a
CYP1A1*2A	1.93	India	Shah PP y cols., 2008 ^b
CYP1A1*2A	1.97	Asiática	Lee KM y cols., 2008
CYP1A1*2C	0.63*	Coreana	Yoon KA y cols., 2008
CYP1A1*2B	7.6	Mexicana	Gallegos-Arreola y cols., 2008
CYP1A1*4	11.5	Mexicana	Gallegos-Arreola y cols., 2008
CYP2E1*5B	0.73	Asiática	Zhan y cols., 2010
GTSPi Ile105Val	2.3	Coreana	Sreeja y cols., 2008
GSTT1*0	2.9	Coreana	Sreeja y cols., 2008
GSTT1*0	5.04	Mexicana	Gallegos-Arreola y cols., 2004
EPHX1 Tyr113His	0.2*	Alemana	Rosenberg y cols., 2008
GPX1 Pro200Leu	0.6*	Alemana	Rosenberg y cols., 2008
NQO1 Pro Ser	1.35	Coreana	Eom S y cols., 2009
ABCC1	1.37	China	Wang H y cols., 2009
MMP8 C+17G	0.65*	Española	González-Arriaga y cols., 2008
XRCC1 Arg399Gln	1.16	China	Zheng H y cols., 2009
TP53 Arg72Pro	1.32	Española	Fernández-Rubio y cols., 2008
TP53 Intrón 6	1.29	Caucásica	Wang W y cols., 2007
TP27	1.27	Caucásica	Wang W y cols., 2007
CASP5 Val318Leu	2.47	Rusa	Ulybina YM y cols., 2009
CASP8 His302Asp	2.26	Rusa	Ulybina YM y cols., 2009
DR4 Lys441Arg	1.89	Rusa	Ulybina YM, et al, 2009
MDM2 309	1.56	Caucásica	Liu G y cols., 2008
CCND1 G870A	1.26	Caucásica	Wang W y cols., 2007
IL-1B T-31C	1.51	Caucásica	Vogel U y cols., 2008
MGMT Leu84Phe	1.25	China	Zhong y cols., 2010

**Polimorfismos que tienen un efecto protector en la población que fueron analizados.*

En México existen pocos estudios de epidemiología molecular del cáncer y como se mencionó anteriormente, no se pueden extrapolar los resultados de una población a otra, por lo que resulta muy importante caracterizar a la población mexicana que, además, es una mezcla compleja de varias poblaciones.

Entre los estudios realizados en México, Gallegos-Arreola y cols., (2004, 2008) reportan una asociación de los polimorfismos *GSTT1*0* y *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* y *CYP1A1*4* con el cáncer pulmonar, en pacientes mestizos mexicanos (ver Tabla 1.2).

También se han reportado en población mexicana, las frecuencias de algunos de los polimorfismos de riesgo en genes candidatos (Tabla 1.3), aunque en estos estudios no se analiza la asociación de dichos polimorfismos con algún tipo de cáncer.

Tabla 1.3. Frecuencias alélicas en polimorfismos de genes candidatos analizados en población mexicana.

Gen/Polimorfismo	Frecuencia alélica del polimorfismo	Referencia
<i>CYP1A1*2A</i>	0.27	Gallegos-Arreola y cols., 2008
<i>CYP1A1*2C</i>	0.56 y 0.54	Montero y cols., 2007 y Pérez-Morales y cols., 2008
<i>CYP1A2 (5' UTR)</i>	0.53	Castorena-Torres y cols., 2005
<i>GSTT1*0</i>	0.093 y 0.12	Montero y cols., 2007 y Pérez-Morales y cols., 2008
<i>GSTM1*0</i>	0.42 y 0.33	Montero y cols., 2007 y Pérez-Morales y cols., 2008
<i>CYP2E1*5B</i>	0.3	Mendoza-Cantú y cols., 2004
<i>CYP2D6 (PM)</i>	0.068	Sosa-Macías y cols., 2006

1.5.4. Genes candidatos de susceptibilidad genética a cáncer pulmonar

En este estudio se incluyeron algunos genes candidatos que participan a distintos niveles de la vía metabólica que siguen algunos carcinógenos, a continuación se dará una breve descripción sólo de los genes que fueron incluidos en este estudio.

1.5.4.1. Receptor de arilos (AhR)

El receptor de arilos es codificado por el gen *AHR* localizado en el locus 7p15; es un miembro de la familia de los factores de transcripción bHLH-PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim). Se encuentra unido a las proteínas HSP90, a p23 y a XAP2 que funcionan como chaperonas, estas proteínas se disocian cuando existen ligandos del receptor, ocurre la unión ligando-receptor y el complejo viaja al núcleo donde es reconocido por el traslocador Arnt. El complejo Ahr-ligando-Arnt se trasloca al núcleo y se une a secuencias XRE (xenobiotic response elements) promoviendo la transcripción de genes que contienen dichos elementos (Quiang y cols., 2003). Entre los ligandos exógenos del AhR se encuentran el benzo[a]pireno, TCCD, 3MC, entre otros, y entre los ligandos endógenos se encuentran derivados del triptófano y metabolitos del ácido araquidónico. El AhR es considerado un gen esencial ya que los ratones knockout presentan deficiencias en el desarrollo del sistema neural y los fetos mueren antes de llegar a término, mientras que los mutantes condicionales muestran gran resistencia a altas dosis de carcinógenos como los HAP's y las dioxinas.

El gen presenta múltiples SNPs (Single Nucleotid Polymorphism) situados en distintos dominios del gen (Figura 1.5). Koyano y cols., (2005) realizan un estudio de las variantes polimórficas expresadas en células HeLa y encontraron que los niveles de mRNA son similares en las variantes analizadas, sin embargo las variantes K401R y N487D mostraron una actividad transcripcional reducida (medida por la expresión de CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, UGT1A1 y UGT1A6), en respuesta a los ligandos BNF y 3MC.

Por otro lado, el polimorfismo R554K se encuentra en el dominio de transactivación y no se encontraron diferencias en la actividad transcripcional de esta variante, con respecto a la variante silvestre, sin embargo este polimorfismo se ha asociado con la susceptibilidad a padecer cáncer pulmonar en diversos estudios (Chen y cols., 2009).

El receptor AhR se expresa principalmente en placenta, pulmón, corazón, páncreas e hígado (Koyano y cols., 2005)

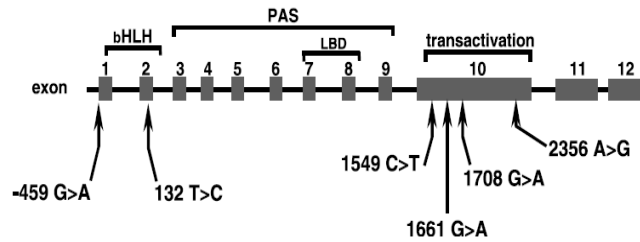


Figura 1.5. Estructura del gen AhR, los SNP's más estudiados y los distintos dominios en la proteína.
Tomado de Harper y cols, 2002.

1.5.4.2. Citocromo P450 1A1

El citocromo P540 1A1 es una enzima codificada por el gen *CYP1A1* localizado en 15q 22-24, pertenece al grupo de las hemo-oxigenasas que catalizan reacciones de óxido-reducción, el *CYP1A1* participa en la biotransformación de muchos carcinógenos convirtiéndolos en metabolitos más reactivos capaces de unirse al DNA (Kawajiri, 1999). Se ha observado que la inducción del *CYP1A1* se lleva a cabo por el reconocimiento del receptor AhR con su ligando (Quiang y cols., 2003).

Se han descrito varios SNPs en el gen del *CYP1A1*, entre los más estudiados se encuentran el *CYP1A1*2C* (A4889G) que produce el intercambio de aminoácidos isoleucina por valina en el codón 462 (Ile462Val) (Hayashi y cols., 1991) y el *CYP1A1*4* (C4887A) que produce el intercambio de aminoácidos treonina por asparagina en el codón 461 (Thr461Asn) (Cascorbi y cols., 1996). Ambos polimorfismos se encuentran en el exón 7 del gen que corresponde al sitio catalítico de la proteína. Otro polimorfismo es el *CYP1A1*2A* que produce un cambio T6235C en la región 3' no codificante del gen (Kawajiri, 1999) y el *CYP1A1*3* que produce un cambio T5639C también en la región 3' no codificante (Crofts y cols., 1993), ambos polimorfismos introducen un sitio de restricción para la enzima MspI. En distintas poblaciones los polimorfismos *CYP1A1*2A*, *CYP1A1*2C* y *CYP1A1*4* han sido asociados con el riesgo de padecer cáncer pulmonar, mientras que el *CYP1A1*3* se ha descrito como un polimorfismo raza-específico de la población africana.

El análisis fenotípico de las enzimas polimórficas muestra que las variantes CYP1A1*2C y CYP1A1*4 presentan una alta afinidad por los sustratos y un incremento en la V_{max} , sin embargo la enzima silvestre es la que genera intermediarios reactivos (BPDE) con mayor eficiencia que las variantes polimórficas, no obstante es posible que *in vivo* las variantes CYP1A1*2C y CYP1A1*4 generen intermediarios reactivos más eficientemente ya que presentan una K_m menor y alcanzan la V_{max} más rápidamente (Schwarz y cols., 2001). En el caso del polimorfismo CYP1A1*2A se ha sugerido que incide en la inducibilidad de la enzima ya que se encuentra vecino a los XRE que gobiernan la regulación del CYP1A1, y en el caso del polimorfismo CYP1A1*3 no se ha asociado con alguna alteración en la proteína (Kawajiri, 1999).

El CYP1A1 se expresa en linfocitos y en órganos como el hígado, pulmones, cerebro y corazón (Anzenbacher y Anzenbacherová, 2001).

1.5.4.3. Citocromo P450 2E1

El citocromo P450 2E1 es una enzima codificada por el gen *CYP2E1* localizado en la posición 10q24.3, esta enzima pertenece al grupo de las mono-oxigenasas de la superfamilia de los citocromos P450. El CYP2E1 metaboliza carcinógenos como el benceno y las *N*-nitrosaminas, además se ha determinado que es el sistema principal de metabolización del etanol y la expresión de la enzima es inducible por su consumo. Se ha reportado que la regulación de la expresión del *CYP2E1* involucra mecanismos transcripcionales, post-transcripcionales y post-traduccionales; algunos de ellos podrían estar relacionados con los polimorfismos en la región 5' reguladora del gen, ya que esta región se encuentra altamente conservada (Uchimoto y cols., 2007). Uno de los polimorfismos más estudiados es el *CYP2E1*5B* que produce la pérdida del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *RsaI*. Watanabe y cols., (1991) reportaron que el cambio producía un incremento en la transcripción del gen y Ueshima y cols., (1996) reportaron que la tasa de eliminación del acetaminofen es significativamente más alta en pacientes portadores del genotipo *CYP2E1*5B / CYP2E1*5B*, este genotipo también ha sido relacionado con la susceptibilidad a padecer cáncer pulmonar, en distintas poblaciones (Zhan y cols., 2010).

El CYP2E1 se expresa principalmente en hígado, donde se encuentran los niveles de expresión más altos, además se expresa en pulmones, ovarios, glándulas mamarias (www.genatlas.org) y linfocitos (Abdel-Rahman y cols., 2000^a).

1.5.4.4. Epóxido hidrolasa

La epóxido hidrolasa microsomal (mEH), es codificada por el gen *EPHX1* localizado en 1q42.1. La expresión de la mEH es inducida por muchos xenobióticos vía receptor AhR, y aunque también participa en el metabolismo endógeno su actividad ha sido mejor caracterizada utilizando algunos compuestos químicos. La mEH presenta un papel dual ya que puede actuar como enzima de desintoxicación y por otro lado puede activar algunos pro-carcinógenos. Una de las reacciones mejor caracterizadas es la biotransformación del B[a]P, donde éste es sustrato del CYP1A1 y posteriormente es sustrato de la mEH, esta última enzima es la que produce los *trans*-di-hidrodiol que son intermediarios altamente reactivos, mutagénicos y carcinogénicos; como el benzo[a]pireno 7,8-diol-9,10 epóxido (BPDE), estos metabolitos son capaces de interactuar con el DNA, RNA y proteínas (Hasset y cols., 1994). Los metabolitos derivados de la actividad de la mEH pueden ser sustrato nuevamente del CYP1A1 o de las glutatión transferasas (Figura 1.6), completando así el metabolismo de desintoxicación y excreción de los xenobióticos (Lodovici y cols., 2004).

El gen *EPHX1* posee varios polimorfismos de los cuales los más estudiados son el *EPHX1 Tyr113His* localizado en el exón 3 y el *EPHX1His139Arg* localizado en el exón 4. Hasset y cols., (1994) determinaron la actividad enzimática de estas variantes polimórficas y encontraron que el alelo 113His reduce la actividad 50% y también disminuye la cantidad de metabolitos reactivos, la variante 139Arg incrementa su actividad 25%, aumentando también los metabolitos reactivos, mientras que las combinaciones His113/Arg139 y Tyr113/His139 presentan actividades similares y producen cantidades similares de metabolitos reactivos. De acuerdo con estos resultados, Voho y cols., (2006) reportaron que el alelo 113His tiene un efecto protector en pacientes con cáncer pulmonar, esto se explica por la baja actividad de la enzima debido a que los individuos portadores del genotipo *EPHX1 His113* homócigos generan pocos metabolitos reactivos que pueden dañar el

DNA, RNA y proteínas. La mEH se expresa en muchos tejidos, incluyendo los pulmones y el tracto aero-digestivo (www.genatlas.org).

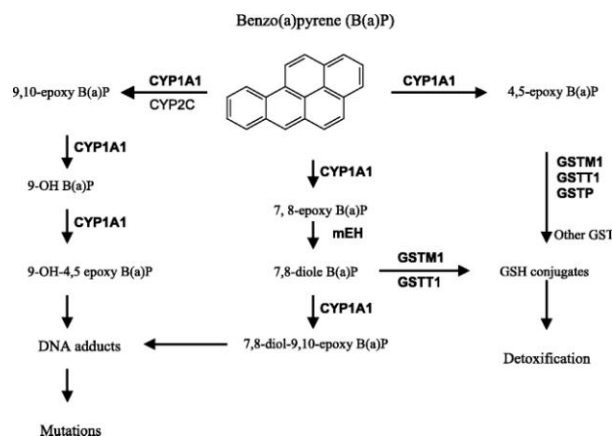


Figura 1.6. Metabolismo del benzo[a]pireno. Tomado de Lodovici y cols., 2004.

1.5.4.5. Glutación transferasas (GST)

Las GST son una superfamilia de isoenzimas que participan en la desintoxicación celular de un amplio rango de compuestos químicos (agentes tóxicos y genotóxicos) a través del metabolismo de fase II. El proceso de desintoxicación se lleva a cabo mediante la conjugación de compuestos hidrofóbicos electrofílicos con el glutatión, lo que permite generar moléculas hidrofílicas fáciles de excretar (Mohr y cols., 2003), aunque a través del metabolismo de la GST clase theta se pueden activar algunos compuestos halogenados que son potencialmente dañinos para las células y su estabilidad genómica (Landi, 2000).

Por otro lado, Ouaisi y cols., (2002) y Oakley, (2005) reportaron la participación de GST's en la síntesis de hormonas esteroides, prostaglandinas y en la modulación de la respuesta inmune.

Las GST's de humanos son codificadas por una superfamilia de genes organizados en tándem, las proteínas se han clasificado de acuerdo con la similitud en su secuencia de aminoácidos en las clases: alfa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta (Mannervik y cols., 2005). Cada clase tiene un número variable de isoenzimas y se ha descrito que pueden compartir algunos sustratos aunque con distinta afinidad, de tal forma que la falta de actividad de alguna isoenzima puede ser parcialmente

suplida por otra. La expresión de GST's es diferencial y puede ser regulada por la presencia de algunos polimorfismos que han sido estudiados principalmente en las clases mu, pi y theta.

Glutación transferasa *Mu* (GSTM1)

La familia Mu se encuentra organizada en tandém dentro del cromosoma 1p13 y la enzima GSTM1 es uno de los cinco miembros que la conforman. La GSTM1 conjuga compuestos derivados del metabolismo primario de HAP's, como epóxidos y especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas durante el estrés oxidante; la falta de esta enzima favorece que los compuestos bioactivados por el metabolismo de fase I generen aductos en el DNA (Hayes y cols., 2005).

Los polimorfismos de esta familia consisten en deleciones (*GSTM1* y *GSTM3*) y SNP's (*GSTM1*, *GSTM3* y *GSTM4*) (Vineis y cols., 1999). El polimorfismo *GSTM1*0* es causado por una deleción en el gen que impide la expresión de la proteína funcional. Seidergard y cols., (1988), reportaron la falta de actividad del óxido de *trans*-stilbeno que es un compuesto metabolizado por la GSTM1 en individuos portadores de genotipos nulos en condición homóciga. Por otro lado, Lodovici y cols., (2004) reportan la asociación de *GSTM1*0* con un incremento en los niveles de aductos de BPDE-DNA, y Mohr y cols., (2003) reportan la asociación del polimorfismo *GSTM1*0* con distintos tipos de cáncer. Estos autores reportan que la GSTM1 se expresa principalmente en hígado, estómago, cerebro, pulmones y nasofaringe, entre otros.

Glutación transferasa *Theta* (GSTT1)

El gen de la GSTT1 se encuentra localizado en el cromosoma 22q11.2, en este loci se han identificado 2 genes: *GSTT1*, *GSTT2* y un pseudogen. Los sustratos más conocidos de GST theta son el diclorometano (DCM), los compuestos halogenados como el clorhidrato de *p*-nitrobencilo (PNBC), el dibromuro de etileno (DBE), el bromuro de *p*-nitrofenilo (PNPB), el cloruro de metilo (MeCl), el yoduro de metilo (MeI), además de varios metanos y etanos halogenados, la GSTT1 transforma estas moléculas en mutágenos electrofílicos, potencialmente dañinos para las células (Landi, 2000), por lo que en estos compuestos funciona como bioactivador, mientras que para

algunos metabolitos de HAP's funciona como enzima de desintoxicación, no obstante presenta menor afinidad por estos sustratos (Mannervik y cols., 2005).

Existen pocos reportes acerca de los polimorfismos en la clase theta, Pemble y cols., (1994) reportan un polimorfismo nulo (*GSTT1*0*) similar al de *GSTM1*0*, en el que una deleción también impide la expresión funcional de la enzima. Se han realizado distintos estudios donde se relaciona este genotipo con el incremento de aductos en el DNA (Ketelslegers y cols., 2006) y con el riesgo de padecer algún tipo de cáncer (Landi, 2000).

Se expresan altos niveles de GSTT1 en hígado y en menor cantidad en eritrocitos, pulmones, riñones, cerebro, músculo esquelético, intestino delgado y corazón, mientras que la actividad de GSTT no ha sido detectada en linfocitos (Landi, 2000).

Glutación transferasa Pi (GSTP1)

El gen *GSTP1* se localiza en la posición 11q13.2 siendo el único miembro de la familia Pi, como las otras GST's, esta enzima juega un papel central en la inactivación de compuestos electrofílicos tóxicos y carcinógenos, presenta afinidad por diversos sustratos entre ellos algunos derivados del benceno (Zimniak y cols., 1994).

Se ha sugerido que la isoforma GSTP1 es la principal enzima involucrada en la inactivación de los carcinógenos del humo del tabaco, como los diol-epóxidos del benzo[a]pireno y otros componentes tóxicos del humo del tabaco, como la acroleína. (Hayes y cols., 2005).

Se han reportado pocos polimorfismos en este gen y el más estudiado es el *GSTP1 Ile105Val*, el cual fue caracterizado bioquímicamente por Zimniak y cols., (1994) quienes reportaron que las variantes Ile105 y Val105 presentan características físico-químicas muy similares, incluso en la afinidad por el glutatión. Sin embargo, la variante Val105 presenta un valor de Km de 3M usando como sustrato el 1-cloro 3,4- dinitrobenceno, mientras que la Km de la variante Ile105 fue de 0.82, así mismo los valores de K_{cat} fueron de 58.8 y de 52.5 para Ile105 y Val105, respectivamente; esto sugiere que la variante Val105 es menos eficiente para desintoxicar compuestos electrofílicos reactivos.

Por otro lado, se ha reportado que el gen *GSTP1* es inactivado por hipermetilación en estadios tempranos del desarrollo carcinogénico y se encuentra sobre-expresado en células tumorales, lo cual contribuye a la resistencia del tumor hacia los fármacos anticáncer (Harries y cols., 1997). Además, algunos estudios han asociado el genotipo *GSTP1 105 Val/Val* con la susceptibilidad a padecer cáncer pulmonar (Sreeja y cols., 2008)

La *GSTP1* se expresa en una gran variedad de órganos y tejidos, entre ellos, los pulmones, intestinos, colon, sistema reproductivo, córnea, queratinocitos y células epiteliales, entre otros (GeneAtlas).

1.5.4.6. X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1)

El gen *XRCC1* se encuentra localizado en el locus 19q13.31, codifica una proteína nuclear del tipo “dedos de zinc” la cual interactúa con el DNA. *XRCC1* no presenta actividad enzimática, pero interactúa con enzimas clave implicadas en la vía de reparación por escisión de bases (vía de reparación BER), como la polimerasa ADP-ribosa, la DNA polimerasa β , la DNA ligasa III y la AP endonucleasa (Kelsey y cols., 2004). Este complejo proteico-enzimático repara aductos en el DNA que son causados por algunos carcinógenos como los HAP’s y la NNK, entre los aductos reparados se encuentran los del tipo “bulky” y las rupturas en una sola cadena causadas por la radiación ionizante (Zhou y cols., 2003). Además la vía BER actúa sobre sitios apurínicos/apirimídicos (AP) producidos por el estrés oxidante endógeno (Duell y cols., 2000).

Se conocen varios polimorfismos en el gen, entre ellos tres que generan intercambio de aminoácidos en regiones altamente conservadas; *XRCC1 Arg194Trp*, *XRCC1 Arg280His* y *XRCC1 Arg399Gln*. Uno de los polimorfismos más estudiados es el *Arg399Gln* y se ha reportado que los portadores del genotipo *Gln399* presentan altos niveles de aductos en el DNA (Zhou y cols., 2003) y un incremento en el número de aberraciones cromosómicas (Abdel-Rahman y cols., 2000), lo que podría deberse a una interacción inadecuada entre la proteína *XRCC1* y el DNA a ser reparado, lo cual incidiría en la tasa de reparación. Adicionalmente, en algunas poblaciones el genotipo *Gln399* ha sido relacionado con la susceptibilidad de desarrollar cáncer de pulmón (Ziennoldiny y cols., 2006). La *XRCC1* se expresa en distintos órganos y tejidos como el cerebro, pulmones, útero y células epiteliales, entre otros (GeneAtlas).

1.5.4.7. Excision repair cross-complementing group 2 (ERCC2)

El gen *ERCC2* también conocido como *XPD* (xeroderma pigmentosum, complementation group D), se encuentra localizado en 19q13.32, codifica una helicasa ATP-dependiente y forma parte del complejo de las aproximadamente 20 proteínas involucradas en la reparación del DNA por escisión de nucleótidos (vía de reparación NER). *XPD* tiene un papel dual ya que participa en la reparación NER del DNA y en la transcripción basal (Spitz y cols., 2001).

La vía NER remueve y corrige fragmentos de oligonucleótidos contenidos en una gran variedad de lesiones como las inducidas por luz UV, aductos “bulky” y otros entrecruzamientos generados por carcinógenos conocidos, entre ellos derivados del benceno (BPDE), fenoles y quinonas (Duell y cols., 2000).

Existen 17 polimorfismos en el gen, los más estudiados son *XPD^{Lys751Gln}* y *XPD^{Asn312Asn}*. Affato y cols., (2004) reportaron un incremento en el intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de individuos con genotipo *XPD^{Asn312}*, mientras que Abdel-Rahman^b y cols., (2000) reportaron un incremento en el número de aberraciones cromosómicas en linfocitos de individuos con genotipo *Gln751*, utilizando ensayos de sensibilidad a mutágenos con NNK. Además varios reportes han asociado las variantes *Gln751* y *Asn312* con el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar (Spitz y cols., 2000, Vineis y cols., 2008).

La *XPD* se expresa en hígado, páncreas, cerebro, pulmones, linfocitos y células NK, entre otros (GeneAtlas).

1.5.4.8. O⁶-metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT)

El gen *MGMT* se encuentra localizado en 10q26.3 y codifica una enzima metil-transferasa que participa en la reparación del DNA. La *MGMT* repara el DNA dañado por la alquilación aberrante, causada por fuentes endógenas como la nitrosaminación de aminas, la lipoperoxidación y la ruptura de amidas; así como el daño causado por fuentes exógenas, entre ellas los componentes del humo del tabaco, productos de la combustión de energéticos y por ciertos agentes quimioterapéuticos (Bugni y cols., 2007). La lesión causada es un aducto de O⁶- metilguanina (O⁶MeG), que es producido por la alquilación en la posición S_N1 y su ruptura por una especie reactiva metilada. Los

aductos O⁶MeG son una fuente común de transiciones G----A, debido a un apareamiento preferencial del aducto con la timina durante la replicación. El O⁶MeG:T es reconocido por la maquinaria de reparación (mismatch), que escinde la timina e inserta otra timina en la cadena opuesta al aducto; esta reparación errónea puede generar intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas e incluso el arresto del ciclo celular y la apoptosis (Bugni y col., 2007).

La MGMT realiza una transferencia irreversible del grupo metilo del aducto O⁶MeG y lo sustituye por un sulfuro de la cisteína del sitio activo (Cys145), esta transferencia modifica el sitio Cys145 generando un cambio conformacional que permite que la MGMT sea blanco de degradación por ubiquitinación; de tal forma que la tasa de reparación depende de la cantidad de proteína activa circulante, ya que una proteína repara solamente un aducto (Niture y cols., 2007).

Se han detectado cientos de polimorfismos en el gen *MGMT* y sólo nueve que generan cambio de aminoácidos han sido depositados en la base de datos del NCBI SNP; entre ellos *Leu84Phe*, *Ile143Val* y *Lys178Arg* que son los más estudiados. Se realizó un análisis bioquímico de las variantes polimórficas y no parece haber cambios significativos en la actividad de la proteína. Sin embargo, Hill y cols., (2005) reportaron que el alelo *Phe84* se encuentra relacionado con un incremento en el número de aberraciones cromosómicas en linfocitos tratados con NNK y Ziennoldiny et al, (2006) reportan que el genotipo *Phe/Phe (84)* incrementa el riesgo de padecer cáncer pulmonar.

Los polimorfismos *Leu84Phe* e *Ile143Val* se encuentran cercanos al sitio Cys145, que es clave en la actividad enzimática, esto fue revelado por el análisis cristalográfico y de actividad *in silico*, que determino que la variante *Phe84* es rara e inestable (Bugni y cols., 2007) (Fig. 1.7), no obstante es necesario comprobar estos datos experimentalmente.

La proteína MGMT se expresa en estómago, pulmones, riñones, intestinos, útero, ovarios, próstata, monocitos y linfocitos (Geneatlas), además se encuentra sobre-expresada en tumores malignos y en líneas celulares, posiblemente como un mecanismo de resistencia a agentes quimioterapéuticos (Niture y cols., 2007).

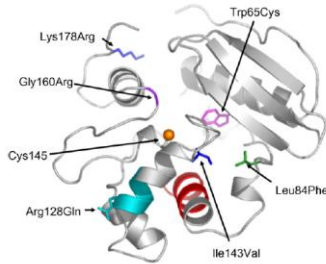


Figura 1.7. Estructura cristalográfica de la MGMT que muestra las posiciones de los polimorfismos de la enzima. Tomado de Bugni y cols., 2007

1.5.4.9. Ciclina D1 (CCND1)

El gen que codifica para la ciclina D1 se encuentra localizado en 11q13, la ciclina es una proteína dependiente de cinasas que participa en el control del ciclo celular, específicamente en la progresión de G1 a la fase S; las ciclinas presentan un patrón de expresión diferencial a lo largo del ciclo celular y son degradadas después de cumplir su función. La CD1 se une a las cinasas CDK2, CDK4 y CDK6, durante la fase G1, entre éstos el complejo CD1/CDK4 es el que tiene mayor actividad de cinasa; la actividad de cinasa es controlada negativamente por las proteínas p15^{INK4A}, p16^{INK4B}, p18^{INK4C} y p19^{INK4D} que forman un complejo binario con CDK4 y CDK6, bloqueando así la transición de G1-S (Gautschi y cols., 2006). La ciclina D1 se une a CDK4 y CIP/KIP, lo que permite su entrada al núcleo y que fosforile a Rb, esto promueve la liberación del factor de transcripción E2F y la progresión de G1-S. Durante la transición, GSK-3 β entra al núcleo y fosforila a la ciclina D1 en la treonina 286, esto permite que la ciclina D1 sea exportada del núcleo por Crm1 y sea degradada por el proteosoma 26S (Fig. 1.8) (Wang y cols., 2002).

Se han descrito algunos mecanismos por los cuales la función y localización de la ciclina D1 pueden ser alteradas, entre ellos se encuentra el polimorfismo G870A en el intrón 4 que provoca la pérdida del sitio de restricción *ScrFI*; este polimorfismo reduce la eficiencia del reconocimiento del sitio de splicing, generando un splicing alternativo que da lugar a la proteína ciclina D1b, a la cual le hace falta el sitio de fosforilación Thr286 que permite su salida del núcleo, esto permite su acumulación nuclear y se ha sugerido que la acumulación de ciclina D1 en el núcleo puede promover la transformación maligna de las células (Wang y cols., 2002).

Por otro lado, se ha reportado que el alelo *A870* está asociado con el riesgo de padecer varios cánceres, entre ellos el cáncer de pulmón, vejiga y melanoma de piel (Gaustchi y cols., 2006, Wang y cols., 2002, Knudsen y cols., 2006).

La ciclina D1 se expresa en todas las células en división y se encuentra sobre-expresada en células pre-tumorales, tumorales y en líneas celulares (Knudsen y cols., 2006).

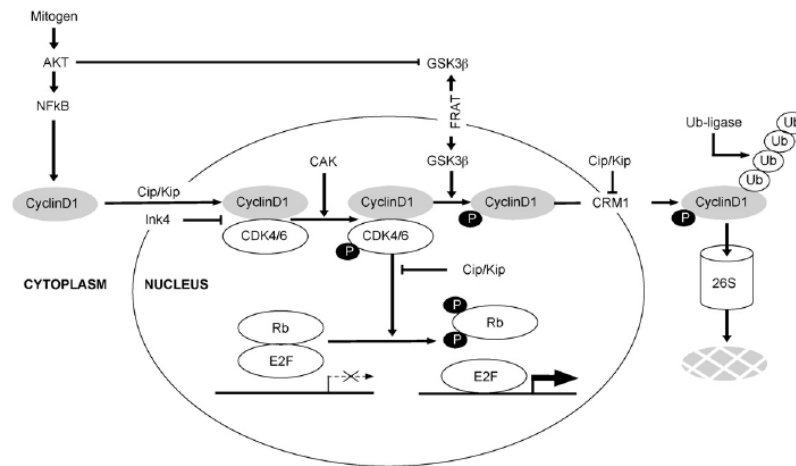


Figura 1.8. Participación y localización de la ciclina D1 durante la fase G1-S del ciclo celular. Tomado de Knudsen y cols., 2006

1.5.4.10. Tumor protein supressor (TP53)

El gen *TP53* se localiza en 17p13 y codifica una proteína nuclear de 53 KDa, la proteína p53 es un supresor de tumores que juega un papel muy importante en el checkpoint del ciclo celular. La proteína p53 se ha denominado el *guardian del genoma*, ya que resguarda su integridad y responde a una gran variedad de estímulos, entre ellos el daño al DNA, la hipoxia, el estrés oxidante y la activación de oncogenes (Fig. 1.9) (Whibley y cols., 2009).

El papel protector de p53 es como factor de transcripción que se une a secuencias blanco en el DNA y modula la transcripción de genes que ejercen su función protectora a través de los mecanismos de arresto del ciclo celular, la apoptosis, el mantenimiento de la integridad genómica, la inhibición de la angiogénesis y la senescencia (Pecorino, 2007).

El supresor de tumores p53 es blanco de mutaciones que provocan la pérdida de su función, favoreciendo el proceso carcinogénico, lo que explica que una gran variedad de tumores presenten mutaciones que inactivan su función (Seker y cols., 2001).

Existen algunos polimorfismos capaces de alterar su función, entre ellos el *Arg72Pro* que se encuentra en una región conservada de poli-prolinas, el análisis genómico comparativo sugiere que el alelo Pro es el ancestral, sin embargo es el alelo Arg el que se encuentra ampliamente representado en algunas poblaciones, por lo que se denominó como el alelo silvestre. Thomas y cols., (1999) reportan las propiedades bioquímicas y biológicas de las variantes Arg72 y Pro72, encontrando que tienen propiedades similares a excepción de la tasa de apoptosis; en este estudio se encontró que la variante Arg72 es capaz de conducir a la apoptosis celular más rápido que la variante Pro72. Existen estudios epidemiológicos que han asociado la variante Pro72 con el riesgo de padecer cáncer, sin embargo los resultados han sido inconsistentes entre poblaciones (Irrarázabal y cols., 2003).

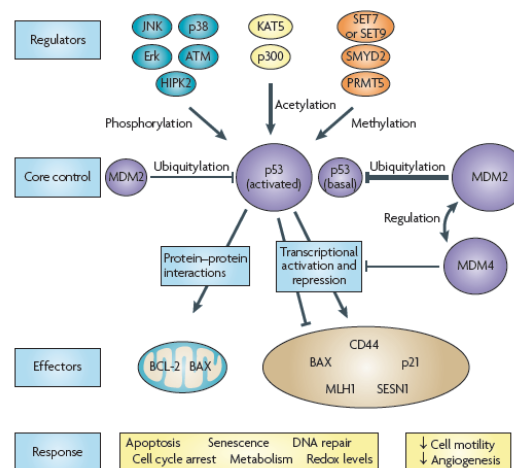


Figura 1.9. Mecanismos celulares dirigidos por p53. Tomado de Whibley y cols., 2009.

CAPÍTULO II

2.1. JUSTIFICACIÓN

Se han producido cambios importantes en la epidemiología del cáncer pulmonar; como las variaciones en el tipo histológico, el incremento en el número de nuevos casos, con un aumento significativo en mujeres y en población menor de 50 años, la tasa de mortalidad sigue siendo la más alta entre las neoplasias, y la mayoría de los pacientes suelen acudir al médico en estadios muy avanzados de la enfermedad cuando ya sólo se les pueden ofrecer tratamientos paliativos con quimio y/o radioterapia.

Por otro lado, el cáncer pulmonar se encuentra estrechamente relacionado con el tabaquismo, el cual es uno de los principales problemas de salud pública que afecta a la población de todos los estratos sociales. Los individuos comienzan a fumar a edades muy tempranas y lo hacen por presión social o por imitación a las personas con las que conviven, y aunque existen fuertes campañas antitabaco los resultados han sido poco alentadores. Una vez iniciado el tabaquismo es muy difícil de abandonar, incluso, aunque el paciente este consiente de las repercusiones que trae a su salud. Existen clínicas especializadas para dejar de fumar, sin embargo son pocos los individuos que logran una rehabilitación total, el resto abandona el tratamiento y continúa fumando hasta que su estado de salud o económico se lo impide.

Es inminente que los fumadores actuales desarrollarán algún tipo de padecimiento relacionado con su hábito tabáquico, entre ellos el cáncer pulmonar, y esto traerá repercusiones importantes en su calidad de vida, además de grandes costos económicos para el sector salud. Es por ello que surge la necesidad de identificar biomarcadores que puedan predecir la susceptibilidad a padecer de cáncer pulmonar e identificar individuos de alto riesgo genético, en los cuales sería posible prevenir, detectar y/o tratar el cáncer en estadios tempranos, esto traería grandes beneficios a la salud del paciente y a su economía, incluso se reducirían los costos que generan a las instituciones de salud los tratamientos contra el cáncer pulmonar.

2.2. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se seleccionaron algunos genes que son importantes en el desarrollo del cáncer pulmonar y se eligieron los polimorfismos que producen una alteración funcional en la proteína codificada (Tabla 2.1) ó en su expresión, y que en trabajos previos (en otras poblaciones) han mostrado una asociación significativa con el riesgo de padecer cáncer pulmonar.

El primer paso para identificar individuos de alto riesgo a padecer de cáncer pulmonar es la determinación de las frecuencias de los polimorfismos en una muestra de población general sana. Se realizó un tamizaje de las frecuencias de los polimorfismos en 100 individuos sanos de población Mestiza Mexicana, con los datos obtenidos se estimó el tamaño de muestra para tener un 95% de confianza en la frecuencia alélica de los polimorfismos analizados. Se obtuvo una n=382 individuos para la frecuencia alélica más alta, por lo que fueron analizados los 16 polimorfismos en esta muestra, en la que se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de cada polimorfismo. Además en esta muestra se realizó el análisis de la variabilidad genética y la estimación teórica (según los datos de OR calculados en otras poblaciones) del riesgo a padecer de cáncer pulmonar.

Para determinar los genotipos que confieren susceptibilidad genética a cáncer pulmonar en nuestra población, realizamos un estudio de casos y controles. Para este análisis se incluyeron únicamente pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar primario y sin tratamiento de quimioterapia; los controles fueron clínicamente sanos (hasta el momento de la toma de muestra), algunos controles de la muestra de población sana fueron incluidos en este estudio. Variables como edad, sexo, tabaquismo e índice tabáquico se tomaron en cuenta para que la diferencia entre ambas muestras fuera no significativa.

Para determinar si realmente los genotipos determinados como *de riesgo*, producen mayor daño genético se realizó un estudio piloto *in vitro*, en el que se trataron linfocitos de un individuo sano que presentó mayor susceptibilidad genética vs linfocitos de un individuo sano de menor susceptibilidad genética (polimorfismos de riesgo según estudios de casos y controles). Los linfocitos se trataron con dos carcinógenos conocidos y se determinó la expresión del mRNA de enzimas importantes en el metabolismo de los mismos, así como el daño genético producido.

Tabla 2.1. Genes analizados en este estudio su relevancia biológica, polimorfismos y alteración en la proteína codificada.

Nombre del gen	Función celular	Polimorfismo	Fenotipo	Alelo de riesgo	Referencia
Receptor de arilos	Receptor de xenobióticos	<i>AhR Arg554Lys</i>	Similar al silvestre	Lisina	Koyano y cols., 2005
Citocromo P450 1A1	Bioactivación de xenobióticos	<i>CYP1A1 T3801C (*2A)</i>	Incremento en la inducibilidad	C	Kawajiri y cols., 1990
Citocromo P450 1A1	Bioactivación de xenobióticos	<i>CYP1A1 Ile472Val (*2C)</i>	Reduce Km, aumenta V_{max}	Valina	Schwartz y cols., 2001
Citocromo P450 1A1	Bioactivación de xenobióticos	<i>CYP1A1 T5639C (*3)</i>	Marcador raza-específico	C	Crofts y cols., 1993.
Citocromo P450 1A1	Bioactivación de xenobióticos	<i>CYP1A1 Thr471Asn (*4)</i>	Reduce Km, aumenta V_{max}	Asparagina	Schwartz y cols., 2001
Citocromo P450 2E1	Bioactivación de xenobióticos	<i>CYP2E1 C1053T (*5B)</i>	Incremento en el mRNA	T	Watanabe y cols., 1991
Epóxido hidrolasa	Hidrolisis de epóxidos	<i>EPHX1 Tyr113His</i>	Actividad disminuida	Tirosina	Hassett y cols., 1994
Epóxido hidrolasa	Hidrolisis de epóxidos	<i>EPHX1 His139Arg</i>	Actividad aumentada	Arginina	Hassett y cols., 1994
Glutación transferasa μ	Eliminación de electrófilos	<i>GSTM1 null</i>	No funcional	Nulo	Seidegard y cols., 1988
Glutación transferase θ	Eliminación de electrófilos	<i>GSTT1 null</i>	No funcional	Nulo	Pemble y cols., 1994
Glutación transferase π	Eliminación de electrófilos	<i>GSTP1 Ile105Val</i>	Aumenta la Km	Valina	Zimniak y cols., 1994
X-ray cross-complementing group 1 (XRCC1)	Reparación del DNA (Vía BER)	<i>XRCC1 Arg 399 Gln</i>	Actividad disminuida	Glicina	Zienolddiny y cols., 2006
Excision repair cross-complementing group 2 (ERCC2)	Reparación del DNA (Vía NER)	<i>ERCC2 Lys751Gln</i>	Actividad disminuida	Glicina	Lunn y cols., 2000
O ⁶ - metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT)	Reparación del daño al DNA. (Reparación directa)	<i>MGMT Leu84Phe</i>	Isoforma inestable y rara	Fenilalanina	Inoue y cols., 2000
Ciclina D1	Progresión del ciclo celular	<i>CCND1 G870A</i>	Splicing alternativo	A	Betticher y cols., 1995
Supresor de tumores	Arresto del ciclo celular, apoptosis	<i>TP53 Arg72Pro</i>	Disminuye la apoptosis	Prolina	Thomas y cols., 1999

2.3. HIPÓTESIS

La susceptibilidad genética individual al cáncer pulmonar está determinada por una combinación de genotipos de riesgo con efecto aditivo, por lo que encontraremos sobre-representación de los genotipos de riesgo en una población de sujetos diagnosticados con cáncer pulmonar primario.

2.4. OBJETIVOS

General

- ⇒ Identificar genotipos que pueden conferir susceptibilidad genética a padecer de cáncer pulmonar.

Específicos

- ⇒ Seleccionar biomarcadores genéticos importantes en el desarrollo de la enfermedad.
- ⇒ Obtener las frecuencias de los polimorfismos genéticos seleccionados en individuos mexicanos sanos.
- ⇒ Determinar el conjunto de genotipos de riesgo más frecuente en la población analizada.
- ⇒ Determinar las frecuencias de los polimorfismos genéticos en pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar primario.
- ⇒ Realizar análisis estadísticos univariados y multivariados para determinar los genotipos que confieren mayor susceptibilidad a padecer cáncer pulmonar.
- ⇒ Determinar en un estudio *in vitro* el daño genético ocasionado por dos carcinógenos conocidos, en linfocitos de dos individuos con distinta carga genética.

CAPITULO III

3. Materiales y Métodos

3.1. Sujetos

En el estudio se incluyeron 382 individuos para el análisis de las frecuencias de los polimorfismos en población general sana, mientras que para el estudio de casos y controles se incluyeron 190 pacientes diagnosticados con cáncer pulmonar primario y 190 controles sanos (algunos fueron tomados de la muestra inicial de 382 individuos). Los sujetos muestreados fueron Mestizos Mexicanos, no relacionados entre sí, con padres y abuelos nacidos en México, todos los participantes respondieron un cuestionario donde se les realizaron preguntas acerca de su lugar de nacimiento, así como el de sus padres y abuelos, edad, género, tabaquismo, estilo de vida, etc.

En el caso de pacientes además se recolectó la información acerca del tipo histológico del cáncer pulmonar, así como datos de relevancia médica y epidemiológica.

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, y el Banco de sangre del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE dio su autorización para utilizar los buffy coat de algunas muestras para extraer el DNA y utilizarlo en este estudio.

3.2. Análisis de los polimorfismos

El DNA genómico se obtuvo a partir de muestras sanguíneas por el método de precipitación con fenol-cloroformo (Sambrook, 1987) y en algunos casos se utilizó el protocolo de precipitación con sales (Lahiri et al, 1991).

El polimorfismo *AhR^{Arg554Lys}* se determinó por PCR tiempo real utilizando la sonda Taqman C_11170747_20 de Applied Biosystems siguiendo las recomendaciones del fabricante (Fig. 3.1).

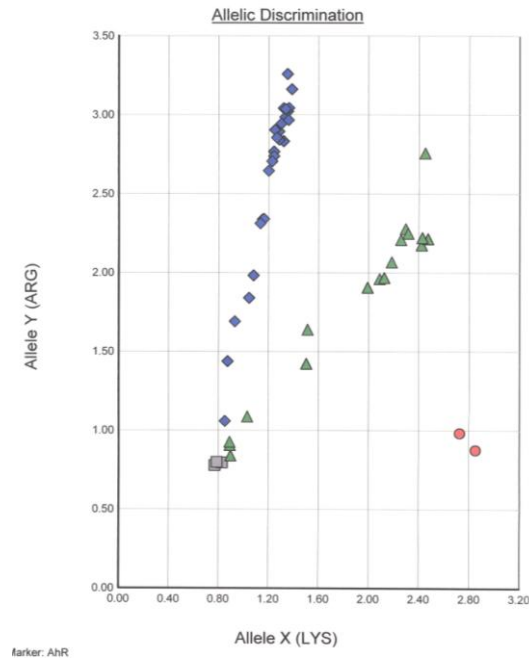


Figura 3.1. Genotipificación del polimorfismo $AhR^{Arg554Lys}$, en el eje X encontramos los homocigos para el alelo lisina, en el eje Y encontramos a los homocigos arginina y los triangulos intermedios corresponden a los heterocigos que presentan ambos alelos arginina/lisina.

Se utilizó la técnica de PCR-RFLP's para los polimorfismos de $CYP1A1^{*2A}$ y $CYP1A1^{*3}$ (Kawajiri, 1999), $CYP1A1^{*2C}$ y $CYP1A1^{*4}$ (Cascorbi y cols., 1996), $CYP2E1^{*5B}$ (Morita, y cols., 1997), $EPHX1^{Tyr113His}$ y $EPHX1^{His139Arg}$ (Smith y Harrison 1997), $GSTP1^{Ile105Val}$ (Zimniak y cols., 1997), $XRCC1^{Arg399Gln}$ (Fig. 3.2) (Abdel-Rahman y El-Zein 2000), $XPDLys751Gln$ (Lunn y cols, 2000), $MGMT^{Leu84Phe}$ (Hill y cols, 2005), $CCND1^{G870A}$ (Wang y cols, 2002) y $TP53^{Arg72Pro}$ (Irrarázabal y cols, 2003). Los polimorfismos de $GSTT1^{*0}$ y $GSTM1^{*0}$ se determinaron por PCR múltiple, utilizando el protocolo reportado por Abdel-Rahman y cols, 1996 (Fig 3.3).

Algunos protocolos fueron modificados, las condiciones de amplificación y los fragmentos de restricción (RFLP's) obtenidos se muestran en la Tabla 3.1

Tabla 3.1. Detalles de los oligonucleótidos, amplicones, enzimas de restricción y condiciones utilizadas para los análisis genotípicos de PCR-RFLP's.

Gen/ Polimorfismo	Oligonucleótidos	Condiciones del PCR	Tamaño amplicón (pb)	Enzima de restricción (unidades)	Tamaño de los fragmentos digeridos (pb)
<i>CYP1A1 T3801C (*2A)</i>	F TAGGAGTCTTGCTCATGCCCT R CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT	94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s	333	<i>Msp I</i> (4)	WT (333) H (333, 208, 125) M (208, 125)
<i>CYP1A1 Ile472Val (*2C)</i>	F CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC R TTCCAGCCGTTGCAGCAGGATAGCC	94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 30s	204	<i>BsrDI</i> (0.4)	WT (149, 55) H (204, 149, 55) M (204)
<i>CYP1A1 T5639C (*3)</i>	F CCAGAGACAACAGGTAACA R ATACCCCCCTCACTCC	94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 30s	321	<i>MspI</i> (4)	WT (321) H (321, 240, 81) M (240,81)
<i>CYP1A1 Thr471Asn (*4)</i>	F CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC R TTCCAGCCGTTGCAGCAGGATAGCC	94°C 30s, 59°C 30s, 72°C 30s	204	<i>Bsal</i> (2)	WT (139, 65) H (204, 139, 65) M (204)
<i>CYP2E1 C1053T (*5B)</i>	F CCAGTCGAGTCTACATTGTCA R TTCATTCTGTCTTAACTGG	94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 30s	412	<i>RsaI</i> (1.5)	WT (352, 60) H (412, 352, 60) M (412)
<i>EPHX1 Tyr113His</i>	F GATCGATAAGTCCGTTTCACC R ATCCTTAGTCTTGAAGTGAGGAT	94°C 20s, 55°C 20s, 72°C 20s	162	<i>EcoRV</i> (1)	WT (140, 22) H (162, 140, 22) M (162)
<i>EPHX1 His139Arg</i>	F GGGGTACCAGAGCCTGACCGT R AACACCGGGCCACCCCTTGGC	94°C 30s, 62°C 30s, 72°C 30s	357	<i>RsaI</i> (1.5)	WT (295, 62) H (295, 174, 121, 62) M (174, 121, 62)
<i>GSTPI Ile105Val</i>	F ACCCCAGGGCTCTATGGGAA R TGAGGGCACAGAAGCCCT	94°C 20s, 60°C 20s, 72°C 20s	176	<i>BsmAI</i> (1)	WT (176) H (176, 91, 85) M (91, 85)
<i>XRCC1 Arg399Gln</i>	F TTGTGCTTCTCTGTGTCCA R TCCTCCAGCCTTTCTGATA	94°C 30s, 57°C 30s, 72°C 60s	615	<i>MspI</i> (4)	WT (384, 231) H (615, 384, 231) M (615)
<i>ERCC2 (XPD) Lys751Gln</i>	F CCCCCTCTCCCTTTCCTCTG R AACCAGGGCCAGGCAAGAC	94°C 20s, 62°C 20s, 72°C 20s	184	<i>MbolI</i> (0.5)	WT (112, 72) H (184, 112, 72) M (184)
<i>MGMT Leu84Phe</i>	F TTCTGCTGCACAGCTAGTTGAG R GCCAAAATAACACAAGTGTGG	94°C 45s, 61°C 45s, 72°C 45s	499	<i>SapI</i> (0.2)	WT (283, 216) H (499, 283, 216) M (499)
<i>CCND1 A870G</i>	F GTGAAGTTCATTCCAAATCCGC R GGGACATCACCTCACTTAC	94°C 20s, 55°C 20s, 72°C 20s	167	<i>ScrFI</i> (1)	WT (145, 22) H (167, 145, 22) M (167)
<i>TP53 Arg72Pro</i>	F CGTGCAAGTCACAGACTTGGC R AATGGATGATTGATGCTGTCCC	94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s	259	<i>Bsh1236I</i> (1)	WT (160, 99) H (259, 160, 99) M (259)

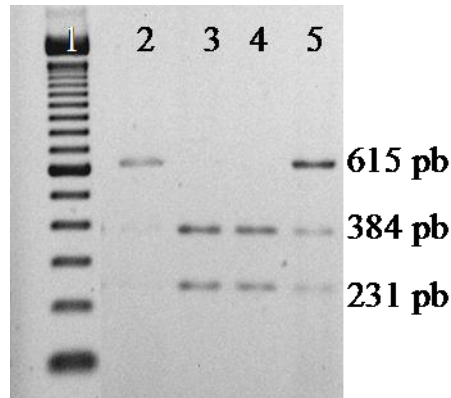


Figura 3.2. Análisis de polimorfismos por PCR-RFLP's tomando como ejemplo el polimorfismo *XRCC1*^{Arg399Gln}. El carril 1 es el marcador de peso molecular 100 pb, el carril 2 es el homócigo Gln/Gln, el carril 3 es el control positivo de restricción de la enzima *MspI*, el carril 4 es el genotipo homócigo Arg/Arg y el carril 5 es el heterócigo Arg/Gln.

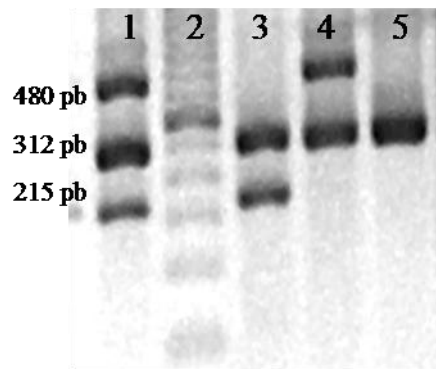
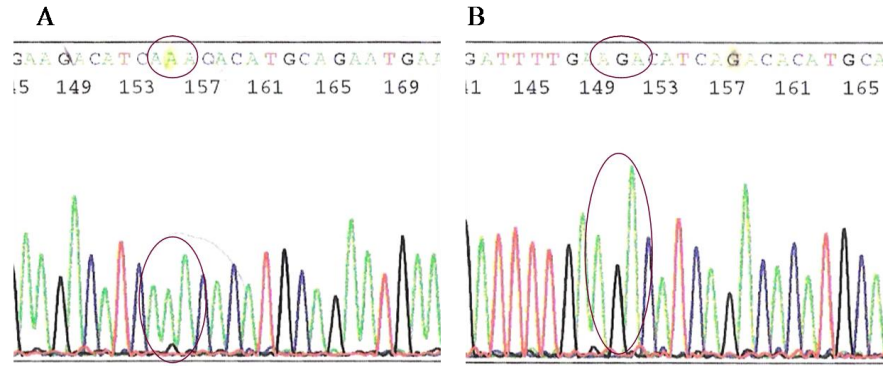
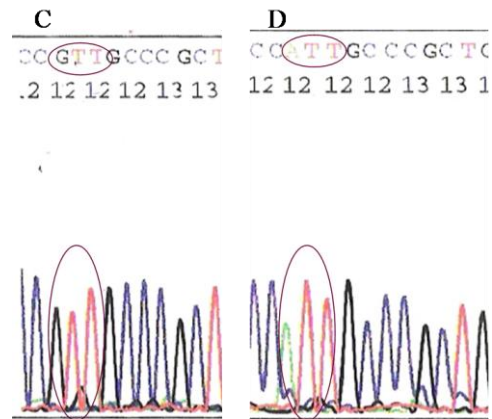


Figura 3.3. Análisis de las deleciones en la *GSTM1* y *GSTT1* por PCR múltiple. La banda de 480 pb corresponde al gen *GSTT1*, la de 312 pb es un control interno de la reacción y corresponde al gen del *CYP1A1* y la banda de 215 pb corresponde al gen *GSTM1*. El carril 1 muestra el control positivo para todos los genes, el carril 2 es el marcador de peso molecular, el carril 3 muestra el genotipo nulo de *GSTT1*, el carril 4 el genotipo nulo de *GSTM1* y el carril 5 muestra ambas *GST*'s con genotipos nulos.

La verificación de algunos genotipos se determinó por secuenciación del DNA (Fig 3.4), para lo cual se purificaron algunos amplicones utilizando el Kit "Purification Product of PCR" (Qiagen). El análisis se llevó a cabo en la Unidad de secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



Secuencias de los sitios polimórficos del gen *AhR*. A) Alelo lisina (AAA), B) Alelo arginina (AGA)



Secuencias de los sitios polimórficos del gen *CYP1A1*. C) Alelo Valina (GTT), D) Alelo Isoleucina (ATT)

Figura 3.4. Verificación de genotipos por secuenciación directa del DNA

3.3. Análisis estadístico

Se determinaron las frecuencias genotípicas y alélicas de cada uno de los genes analizados. El equilibrio de Hardy-Weinberg para la población general sana fue determinado con el programa Gene Pop Versión 4.0.10 (<http://genepop.curtin.edu.au>).

Se realizaron análisis multivariados (conglomerados y análisis jerárquico) para determinar la variabilidad genética de la muestra poblacional y para la estimación del riesgo teórico se utilizó el programa JMP Versión 8. Para determinar los genotipos que confieren susceptibilidad genética, en

el estudio de casos y controles, se utilizó la regresión logística no condicional ajustada por sexo, edad y estatus de tabaquismo usando el programa STATA 10.0. Adicionalmente se analizaron los datos bajo un modelo libre no – paramétrico que permite modelar todas las variables consideradas y para ello se utilizó el programa MDR 10.0.

3.4. Análisis *in vitro* del daño genotóxico por NNK y B[a]P en linfocitos humanos

Se seleccionaron dos individuos uno con mayor cantidad de genotipos de riesgo y otro con menor cantidad de genotipos de riesgo. Se cultivaron los linfocitos de ambos individuos adicionando 500 μ L de sangre entera en un tubo con 4.5 mL de medio RPMI suplementado con 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin, 2mM de L-glutamina y 200 μ L del suero de la sangre de cada individuo; se estimuló la proliferación celular con la adición de 200 μ L de fitohemaglutinina (concentración final de 2%).

Se crecieron los cultivos a 37°C y CO₂ al 5% durante 48 horas, posteriormente se añadieron a cada tubo distintas concentraciones de carcinógenos: NNK (0.24, 0.48 y 0.96 mM) y B[a]P (0.2, 0.4 y 0.6 μ M) disueltos en medio RPMI, se incubaron 24 horas más y se cosecharon a las 72 horas. Se sembró un tubo para extraer DNA, uno para extraer RNA y otro para realizar láminas de células detenidas en metafase. El RNA y el DNA se purificaron por el método de Trizol, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El cultivo para preparar laminillas fue adicionado con 200 μ L de colcemid de Sigma (colchicina) a las 70 horas y se cosecharon las células 2 horas más tarde. Las células fueron centrifugadas y se le adicionó solución hipotónica (KCl 0.075M) a 37°C, se incubaron las células 20 minutos a 37°C y posteriormente se fijaron con una mezcla de metanol y ácido acético glacial (3:1), recuperando la pastilla celular.

Las láminas se prepararon por goteo depositando unas gotas de la pastilla celular directamente en las laminillas, utilizando una pipeta Pasteur y posteriormente las laminillas fueron teñidas con Giemsa.

3.5. Expresión de genes por RT-PCR

Se utilizó la técnica de RT-PCR para medir la expresión de algunos genes implicados en el metabolismo y la respuesta a los carcinógenos NNK y B[a]P. El RNA fue cuantificado en un espectrofotómetro Nanodrop ND1000 de Accesolab, en el cual se determinó la cantidad y pureza, mientras la integridad se determinó por medio de un gel de agarosa al 0.8%.

Se utilizó la transcriptasa MVRL de Invitrogen para preparar el cDNA de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, los oligonucleótidos utilizados en el análisis de RT-PCR fueron:

CYP1A1 5' TTCCGACACTCTTCCTTCGT 3' y 5' ATGGTTAGCCCATAGATGGG 3', para **GSTP1** 5' CACCAACTATGAGGCGGG 3' y 5' ATCAGCAGCAAGTCCAGC 3', para **GSTM1** 5' ACTTTCCCAATCTGCCCTA 3' y 5' TTCTGGATTGTAGCAGATC 3', para **GSTT1** 5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' y 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA 3' y para **GAPDH** 5' GAACGGGAAGCTCACTGGCAT 3' y 5' GCCCTCCGACGCCTGCTTCAC 3'.

Para la reacción de PCR se utilizaron 50 ng de cDNA, 0.2mM de dNTP's, 20pM de cada primer, 1μL de buffer 10X, 2 mM de MgCl, 0.1U de Taq Polimerasa (Invitrogen) y H₂O milli Q para alcanzar un volumen final de 10 μL. Los ciclos del PCR se llevaron a cabo en un termociclador Rapid Cyclor de Idaho Technology.

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% y la intensidad de las bandas se determinó con el programa Image J.

CAPÍTULO IV

4. Resultados y discusión

En la primera parte de este estudio incluimos 382 individuos Mestizos Mexicanos de los cuales el 29% fueron mujeres y el 71% hombres. El rango de edad encontrado en la población de estudio fue entre 18 y 80 años, y el 52% declaró no tener hábitos tabáquicos (Tabla 4.1).

En estos 382 individuos determinamos la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos *AhR*^{Arg554Lys}, *CYP1A1*^{*2A}, *CYP1A1*^{*2C}, *CYP1A1*^{*3}, *CYP1A1*^{*4}, *CYP2E1*^{*5B}, *EPHX1*^{Tyr113His}, *EPHX1*^{His139Arg}, *GSTM1*^{*0}, *GSTT1*^{*0}, *GSTP1*^{Ile105Val}, *XRCC1*^{Arg399Gln}, *ERCC2*^{Lys751Gln}, *MGMT*^{Leu84Phe}, *CCND1*^{G870A} y *TP53*^{Arg72Pro}. Todos los genotipos analizados estuvieron bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg y se encontraron distintos grados de ligamiento entre los polimorfismos de los genes *CYP1A1* y *EPHX1*. Con base en los polimorfismos antes mencionados determinamos la variabilidad genética de la población y usando el *log additive model* (Fletcher y cols., 2010) construimos el modelo poligénico de susceptibilidad a cáncer pulmonar.

Tabla 4.1. Características de la población general sana analizada.

Condición de los individuos	n (%)
Todos	382
Sexo	
Hombres	273 (71)
Mujeres	109 (29)
Promedio edad (años ± SD)	
Todos	39.90 (12.43)
Hombres	39.24 (12.12)
Mujeres	41.53 (13.08)
Fumadores	180 (47)
Hombres	139 (77)
Mujeres	41 (23)
No fumadores	202 (53)
Hombres	134 (66)
Mujeres	68 (34)

Los resultados de este estudio se detallan en el manuscrito “**Polymorphisms associated with the risk of lung cancer in a healthy Mexican Mestizo population: Application of the additive model for cancer**”. Pérez-Morales R., Méndez-Ramírez I., Castro-Hernández C., Martínez-Ramírez OC, Gonsebatt ME., and Rubio J. *Genet Mol Biol* (2011). Accepted 18 July, 2011. In press.

4.1. Estudio de casos y controles

En este estudio eliminamos el polimorfismo *CYP1A1**³ que presentó una frecuencia muy baja en la población general sana y que además es raza-específico de la población africana. Aunque nuestra población presenta componentes genéticos africanos éste no se encontró representado en nuestra muestra poblacional. Por otro lado, no existe suficiente evidencia de que este polimorfismo sea de susceptibilidad a cáncer.

Se incluyeron 190 casos de cáncer pulmonar primario y 190 controles sanos, las características de ambas poblaciones se muestran en la tabla 4.2 en la que se observa que no hay diferencia significativa entre ambos grupos.

Tabla 4.2. Comparación entre casos y controles

Variables	Casos (n=190)	Controles (n=190)	X ²	p
Edad ($\mu \pm sd$)	58.3 (13.8)	52.1 (15.5)	69.11	0.34
Sexo n (%)			0.516	0.473
Hombres	100 (52.6)	93 (48.9)		
Mujeres	90 (47.4)	97 (51.1)		
Tabaquismo n (%)			0.042	0.837
No	94 (49.4)	96 (50.6)		
Sí	96 (50.6)	94 (49.4)		
Índice tabáquico ($\mu \pm sd$)	27.47 (24.08)	16.19 (18.24)	96.75	0.269
Historia familiar de cáncer n (%)				
No antecedentes	115 (60.5)	106 (55.7)	0.876	0.349
Sí antecedentes	75 (39.5)	84 (44.3)		
*Tipo histológico de cáncer n (%)				
Adenocarcinoma	100 (52.7)			
Carcinoma epidermoide	39 (20.5)			
Carcinoma de células pequeñas	27 (14.2)			
Mesotelioma	24 (12.6)			

* Sólo aplica en los pacientes con cáncer pulmonar primario

Entre los casos de cáncer pulmonar se observó que el tipo histológico más frecuente fue el adenocarcinoma, seguido por el epidermoide, el carcinoma de células pequeñas y el mesotelioma que ha sido asociado con la exposición a asbestos. Incluimos los casos de mesotelioma ya que se ha sugerido que los asbestos pueden ser metabolizados por la misma vía que siguen los HAP's (Neri y cols., 2008).

Dentro de la exposición al humo de leña tomamos en cuenta la quema de este material como parte de la rutina doméstica para cocinar, principalmente; en cuanto a la exposición a asbestos el material de construcción de la vivienda, principalmente láminas de techado y tinacos almacenadores de agua, además se incluyó la exposición laboral al asbesto.

Realizamos un análisis multivariado para determinar la correlación entre las variables sexo, edad y tabaquismo con algún tipo histológico específico; además analizamos covariables como la exposición al humo de leña, a asbestos, la co-morbilidad y los antecedentes genéticos de cáncer. Encontramos dos grupos: en el primero destacan el carcinoma epidermoide, el carcinoma de células pequeñas y el mesotelioma, mientras que el segundo contiene todos los casos de adenocarcinoma (Fig. 4.1); analizando las diferencias entre ambos agrupamientos observamos que las variables que difieren significativamente son sexo, tabaquismo y exposición a asbestos (Tabla 4.3).

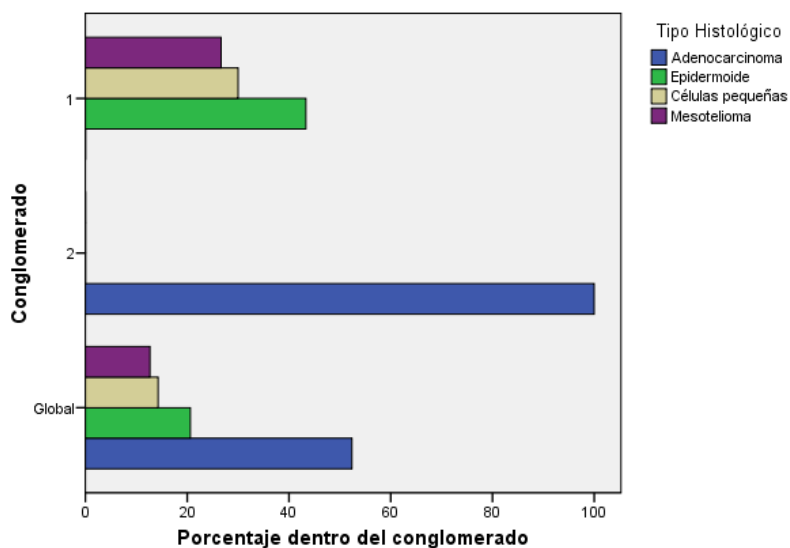


Figura 4.1. Análisis multivariado de variables y covariables en 190 casos de cáncer pulmonar primario.

Tabla 4.3. Análisis de variables y covariables por tipo histológico de cáncer pulmonar.

Tipo histológico	Sexo n (%)		Tabaquismo n (%)		Exposición a humo leña n (%)		Exposición a asbestos n (%)		Co-morbilidad n (%)		Antecedentes genéticos de cáncer n (%)	
	Femenino	Masculino	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Presente	Ausente	Positivo	Negativo
Adenocarcinoma	68 (68)	32 (32)	64 (64)	36 (36)	49 (49)	51 (51)	66 (66)	34 (34)	61 (61)	39 (39)	56 (56)	44 (44)
Carcinoma epidermoide	7 (18)	32 (82)	10 (25)	29 (75)	20 (51)	19 (49)	22 (56)	17 (44)	25 (64)	14 (36)	26 (66)	13 (34)
Carcinoma de células pequeñas	10 (37)	17 (63)	6 (22)	21 (78)	14 (52)	13 (48)	10 (37)	17 (63)	15 (55)	12 (45)	16 (59)	11 (41)
Mesotelioma	5 (21)	19 (79)	14 (58)	10 (42)	15 (63)	9 (37)	5 (21)	19 (79)	19 (79)	5 (21)	17 (71)	7 (29)

Los casos de adenocarcinoma corresponden principalmente a mujeres, sin embargo no hay una asociación significativa con la exposición al humo de leña, como se había sugerido anteriormente (Lissowska y cols., 2005), mientras que el tabaquismo se encuentra sobre-representado en los casos del grupo 1 (carcinoma epidermoide, carcinoma de células pequeñas y mesotelioma) y la exposición a asbestos correlaciona con el mesotelioma, como ya se había reportado previamente (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Diferencia entre variables y covariables por tipo histológico de cáncer pulmonar

Tipo Histológico / Variable	X ²	p
Sexo	38.54	< 0.001
Edad	159.99	0.59
Tabaquismo (IT)	26.078	< 0.001
Exposición a humo de leña	1.415	0.702
Exposición a asbestos	19.655	< 0.001
Co-morbilidad	3.52	0.317
Antecedentes genéticos de cáncer	2.55	0.465

A este respecto, Meibohm y cols., 2002 reportaron que existen diferencias en la expresión génica de enzimas del metabolismo primario y secundario de xenobióticos entre hombres y mujeres; además Tsuchiya y cols., 2005 reportaron que algunos receptores estrogénicos también son capaces de regular la expresión de dichos genes, esto explicaría la diferencia histológica entre los tipos de

cáncer pulmonar, en ambos sexos; sin embargo es necesario realizar más estudios para comprobar estas hipótesis.

4.2. Análisis de las frecuencias genotípicas

Realizamos el análisis de los polimorfismos mencionados y determinamos las frecuencias genotípicas y alélicas en las poblaciones de casos y controles, estos datos se muestran en la tabla 4.5, en la que se observan las diferencias en las frecuencias genotípicas y alélicas encontradas en casos y controles.

Tabla 4.5. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos de interés analizados en casos de cáncer pulmonar primario y en controles.

Polimorfismo	Genotipo	Controles n (%)	Casos n (%)	X ² (p)	Alelo	Controles	Casos
<i>AhR Arg554Lys</i>	<i>Arg/Arg</i>	141 (74)	153 (80)	3.5 (0.17)	<i>Arg</i>	0.86	0.88
	<i>Arg/Lys</i>	46 (24)	32 (17)		<i>Lys</i>	0.14	0.12
	<i>Lys/Lys</i>	3 (2)	5 (3)				
<i>CYP1A1*2C</i>	<i>Ile/Ile</i>	52 (27)	73 (38.5)	5.76 (0.56)	<i>Ile</i>	0.52	0.58
	<i>Ile/Val</i>	92 (49)	73 (38.5)		<i>Val</i>	0.48	0.42
	<i>Val/Val</i>	46 (24)	44 (23)				
<i>CYP1A1*4</i>	<i>Thr/Thr</i>	170 (90)	175 (92)	1.47 (0.47)	<i>Thr</i>	0.95	0.95
	<i>Thr/Asn</i>	18 (9)	12 (6)		<i>Asn</i>	0.05	0.05
	<i>Asn/Asn</i>	2 (1)	3 (2)				
<i>CYP1A1*2A</i>	<i>T/T</i>	55 (29)	68 (36)	3.52 (0.17)	<i>T</i>	0.55	0.57
	<i>T/C</i>	97 (51)	79 (41)		<i>C</i>	0.45	0.43
	<i>C/C</i>	38 (20)	43(23)				
<i>CYP2E1*5B</i>	<i>C/C</i>	126 (66)	146 (77)	6.84 (0.33)	<i>C</i>	0.83	0.86
	<i>C/T</i>	59 (31)	37 (19)		<i>T</i>	0.17	0.14
	<i>T/T</i>	5 (3)	7 (4)				
<i>EPHX1 Tyr113His</i>	<i>Tyr/Tyr</i>	61 (32)	65 (34)	6.21 (0.45)	<i>Tyr</i>	0.49	0.45
	<i>Tyr/His</i>	64 (34)	43 (23)		<i>His</i>	0.51	0.55
	<i>His/His</i>	65 (34)	82 (43)				
<i>EPHX1 His139 Arg</i>	<i>His/His</i>	167 (88)	175 (92)	2.06 (0.35)	<i>His</i>	0.93	0.95
	<i>His/Arg</i>	21 (11)	13 (7)		<i>Arg</i>	0.07	0.05
	<i>Arg/Arg</i>	2 (1)	2 (1)				
<i>GSTM1*0</i>	<i>Positivo</i>	120 (63)	115 (61)	0.27 (0.67)	<i>Positivo</i>	0.63	0.61
	<i>Nulo</i>	70 (37)	75 (39)		<i>Nulo</i>	0.37	0.39

GSTT1*0	Positivo	152 (80)	138 (73)	2.85 (0.11)	Positivo	0.8	0.73
	Nulo	38 (20)	52 (27)		Nulo	0.2	0.27
GSTP1 Ile105Val	Ile/Ile	48 (25)	43 (23)	1.06 (0.58)	Ile	0.49	0.45
	Ile/Val	88 (47)	84 (44)		Val	0.51	0.55
	Val/Val	54 (28)	63 (33)				
XRCC1 Arg399Gln	Arg/Arg	112 (59)	99 (52)	5.28 (0.71)	Arg	0.75	0.73
	Arg/Gln	59 (31)	79 (42)		Gln	0.25	0.27
	Gln/Gln	19 (10)	12 (6)				
MGMT Leu84Phe	Leu/Leu	96 (51)	96 (51)	1.00 (0.60)	Leu	0.69	0.68
	Leu/Phe	73 (38)	67 (35)		Phe	0.31	0.32
	Phe/Phe	21 (11)	27 (14)				
XPD Lys751Gln	Lys/Lys	123 (64)	124 (65)	0.63 (0.72)	Lys	0.76	0.76
	Lys/Gln	46 (25)	41 (22)		Gln	0.24	0.24
	Gln/Gln	21 (11)	25 (13)				
CCND1 G860A	G/G	72 (38)	85 (45)	5.70 (0.58)	G	0.59	0.67
	G/A	82 (43)	85 (45)		A	0.41	0.33
	A/A	36 (19)	20 (10)				
TP53 Arg72Pro	Arg/Arg	98 (52)	101 (53)	0.18 (0.91)	Arg	0.69	0.69
	Arg/Pro	67 (35)	63 (33)		Pro	0.31	0.31
	Pro/Pro	25 (13)	26 (14)				

Las diferencias encontradas se analizaron con el modelo de regresión logística simple y múltiple no condicional, para determinar si los polimorfismos de los genes anteriores podrían conferir susceptibilidad a padecer de cáncer pulmonar, como se ha reportado en algunos estudios publicados en otras poblaciones.

4.3. Genotipos de susceptibilidad genética a cáncer pulmonar en una muestra de población mestiza mexicana.

Los genotipos *CYP1A1*^{*2C} *Ile/Val*, *CYP2E1*^{*5B} *C/T*, *EPHX1*^{Tyr113His} *Tyr/His* y *CCND1*^{G870A} *A/A* tienen un efecto protector en la población analizada, ya que presentan valores de OR inferiores a 1 ($p > 0.05$), mientras que para el polimorfismo *XRCC1*^{Arg399Gln} el genotipo *Arg/Gln* mostró un incremento del riesgo con un OR de 1.54 ($p = 0.06$, marginalmente significativo) (Tabla 4.6). Los genotipos que resultaron protectores corresponden a genes del metabolismo primario de xenobióticos, a excepción del genotipo AA de *CCND1*^{G870A}.

En el caso de los polimorfismos *GSTM1*^{*0}, *GSTT1*^{*0} y *GSTP1*^{Ile105Val} Val/Val se observó un incremento del riesgo, como ya se había reportado previamente en poblaciones asiáticas y caucásicas, sin embargo este incremento del riesgo no fue significativo.

En el caso de los genes de reparación del DNA se encontró un aumento del riesgo en los genotipos homocigos polimórficos de los genes *MGMT*^{Leu84Phe} y *XPDLys751Gln*, sin embargo dichos valores tampoco son significativos.

Tabla 4.6. Distribución de genotipos y OR en población mestiza mexicana.

Genotipos	* Odds Ratio	P [z]	I. Confianza
Receptor de arilos			
<i>Ahr</i> Arg/Arg	1	Ref.	
<i>Ahr</i> Arg/Lys	0.67	0.13	0.39 – 1.13
<i>Ahr</i> Lys/Lys	0.87	0.86	0.19 – 3.97
Genes del metabolismo de fase I			
<i>CYP1A1</i> *2A T/T	1	Ref.	
<i>CYP1A1</i> *2A T/C	0.63	0.06	0.39 – 1.03
<i>CYP1A1</i> *2A C/C	0.83	0.54	0.46 – 1.49
<i>CYP1A1</i> *2C Ile/Ile	1	Ref.	
<i>CYP1A1</i>*2C Ile/Val	0.60	0.04	0.37 – 0.98
<i>CYP1A1</i> *2C Val/Val	0.66	0.15	0.37 – 1.16
<i>CYP1A1</i> *4 Thr/Thr	1	Ref.	
<i>CYP1A1</i> *4 Thr/Asn	0.65	0.28	0.29 – 1.43
<i>CYP1A1</i> *4 Asn/Asn	1.68	0.57	0.26 – 10.5
<i>CYP2E1</i> *5B C/C	1	Ref.	
<i>CYP2E1</i>*5B C/T	0.55	0.01	0.34 – 0.90
<i>CYP2E1</i> *5B T/T	0.87	0.83	0.26 – 2.92
<i>EPHX1</i> (113) Tyr/Tyr	0.98	0.94	0.59 – 1.61
<i>EPHX1</i> (113) Tyr/His	0.57	0.04	0.34 – 0.97
<i>EPHX1</i> (113) His/His	1	Ref.	
<i>EPHX1</i> (139) His/His	1	Ref.	
<i>EPHX1</i> (139) His/Arg	0.56	0.13	0.26 – 1.19
<i>EPHX1</i> (139) Arg/Arg	0.65	0.68	0.08 – 5.11
Genes del metabolismo de fase II			
<i>GSTM1</i>	1	Ref.	
<i>GSTM1</i> *0	1.08	0.72	0.7 – 1.65
<i>GSTT1</i>	1	Ref.	
<i>GSTT1</i> *0	1.36	0.21	0.83 – 2.23

<i>GSTP1</i> Ile/Ile	1	Ref.	
<i>GSTP1</i> Ile/Val	1.05	0.84	0.62 – 1.78
<i>GSTP1</i> Val/Val	1.38	0.25	0.78 – 2.45
Genes de reparación del DNA			
<i>XRCC1</i> (399) Arg/Arg	1	Ref.	
<i>XRCC1</i> (399) Arg/Gln	1.51	0.06	0.96 – 2.37
<i>XRCC1</i> (399) Gln/Gln	0.62	0.28	0.28 – 1.39
<i>MGMT</i> (84) Leu/Leu	1	Ref.	
<i>MGMT</i> (84) Leu/Phe	0.86	0.53	0.55 – 1.35
<i>MGMT</i> (84) Phe/Phe	1.27	0.47	0.65 – 2.45
<i>XPB</i> (751) Lys/Lys	1	Ref.	
<i>XPB</i> (751) Lys/Gln	0.85	0.55	0.51 – 1.42
<i>XPB</i> (751) Gln/Gln	1.13	0.70	0.59 – 2.18
Genes de regulación del ciclo celular			
<i>CCND1</i> (870) G/G	1	Ref.	
<i>CCND1</i> (870) G/A	0.85	0.48	0.54 – 1.33
<i>CCND1</i> (870) A/A	0.50	0.03	0.26 – 0.95
<i>TP53</i> (72) Arg/Arg	1	Ref.	
<i>TP53</i> (72) Arg/Pro	0.95	0.83	0.60 – 1.50
<i>TP53</i> (72) Pro/Pro	1.02	0.94	0.54 – 1.92

* El modelo fue ajustado por edad, sexo e índice tabáquico.

Los resultados obtenidos son distintos a los que se han publicado en otras poblaciones, ya que en nuestra población encontramos que los genotipos que confieren incremento en la actividad y en los niveles del mRNA de enzimas del metabolismo primario, tienen un efecto protector ante el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, mientras que en poblaciones caucásicas dichos polimorfismos se han reportado como de riesgo (Hugh y cols., 2003).

En este estudio encontramos que el polimorfismo Arg554Lys del receptor AhR es protector (OR=0.67 p=0.13), a este respecto Gelhaus y cols., (2010) y Ferecatu y cols., (2010) demostraron que la formación de aductos B[a]PDE-DNA y B[a]PDE-GSH dependen de la activación de genes vía AhR y hasta la fecha no se ha demostrado que el polimorfismo *AhR*^{554Lys} tenga una implicación funcional en la proteína, de tal forma que ambas variantes del receptor *AhR*^{Arg554} y *AhR*^{554Lys} son capaces de inducir los genes que contienen elementos XRE (Koyano y cols., 2005, Celius y Mathews, 2010), además esta asociación no resultó significativa.

Los polimorfismos de *CYP1A1*^{*2A(T/C)} (OR=0.63, p=0.06), *CYP1A1*^{*2C(Ile/Val)} (OR=0.6, p=0.04), *CYP2E1*^{*5B(C/T)} (OR=0.55, p=0.01) y *EPHX1*^{Tyr113His(Tyr/His)} (OR=0.57, p=0.04), resultaron protectores y en estos casos la asociación si fue significativa. El efecto protector podría deberse al incremento en la tasa de metabolización que causan los polimorfismos estudiados en las enzimas CYP1A1, CYP2E1 y EPHX1 que son activadas vía AhR, dichas enzimas podrían activar pro-carcinógenos más rápidamente y los metabolitos reactivos permanecerían menos tiempo en la célula, al ser eliminados como conjugados con el glutatión.

En las enzimas del metabolismo secundario se encontro un pequeño incremento en el riesgo *GSTM1*^{*0} (OR=1.08 p=0.72), *GSTT1*^{*0} (OR=1.36, p=0.21) y *GSTP1*^{Ile105/Val(Val/Val)}, aunque éstos no fueron significativos.

Gelhaus y cols.,(2010) reportaron que la GSTP1 presenta una alta selectividad por los metabolitos B[a]PDE y se expresa principalmente en pulmón, mientras que las isoformas GSTM1 y GSTT1 se expresan principalmente en hígado y presentan una selectividad menor por el B[a]PDE, de modo que el efecto de los genotipos nulos de GSTM1 y GSTT1 serían poco significativos en el riesgo a desarrollar cáncer pulmonar, como se observó en nuestro estudio; mientras que el genotipo Val/Val de *GSTP1*^{Ile105/Val}, que disminuye la eficiencia de unión enzima-sustrato presentó un incremento del riesgo a cáncer pulmonar, aunque como se mencionó anteriormente este riesgo no fue significativo en nuestro estudio.

En el caso de los genes de reparación sólo se encontró un incremento del riesgo, marginalmente significativo, en portadores del genotipo *XRCC1*^{Arg399Gln} (OR=1.51, p=0.06), posiblemente la falta de asociación entre las variantes de genes de reparación sea por el efecto protector de polimorfismos en los genes de los metabolismos primario, ya que los genotipos *MGMT*^{84Phe} y *XPB*^{751Gln} incrementan el riesgo, pero de forma no significativa y como se observa en la figura 4.2 el estrés oxidante que daña al DNA y debe ser reparado por las enzimas de reparación, depende del balance entre la actividad y expresión de las enzimas de los metabolismos primario y secundario.

En el caso del genotipo *CCND1*^{870A} encontramos un efecto protector (OR=0.5, p=0.03), a este respecto Holley y cols., (2005) también reportaron un efecto protector del genotipo G/G en el riesgo

a carcinoma oral de células escamosas, mientras que en los genotipos de p53 no encontramos ninguna asociación con cáncer pulmonar.

A nivel funcional los efectos de ciclina D1 y p53 son antagónicos ya que la ciclina D1 promueve la progresión del ciclo celular a través de la fosforilación de Rb, y el polimorfismo *CCND1^{870A}* genera una variante CD1b que presenta deficiencias en la capacidad de fosforilar a Rb (Lévêque y cols., 2007), lo que indicaría que la isoforma CD1b es ineficiente para promover el ciclo celular; sin embargo en algunos estudios se ha sugerido que la variante AA es de riesgo a desarrollar cáncer (Wang y cols., 2007). Por otro lado, Sofer-Levi (1996) reportó que la alteración en la expresión de ciclina D1 promueve la apoptosis y se ha destacado la importancia de p53 en el control del ciclo celular y la apoptosis, por lo que podría haber un efecto epistático funcional en los efectos de las enzimas polimórficas de dichos genes.

El efecto protector de la variante *CCND1^{870A}* podría deberse a que el polimorfismo hace que la ciclina D1 permanezca más tiempo en el núcleo, debido a la pérdida del sitio de fosforilación y el estímulo podría provocar la activación de p53, subsecuente inducción de la apoptosis y así evitaría la transformación maligna, sin embargo no hay estudios *in vitro* que analicen simultáneamente los polimorfismos de *CCND1* y *TP53* para esclarecer su efecto funcional.

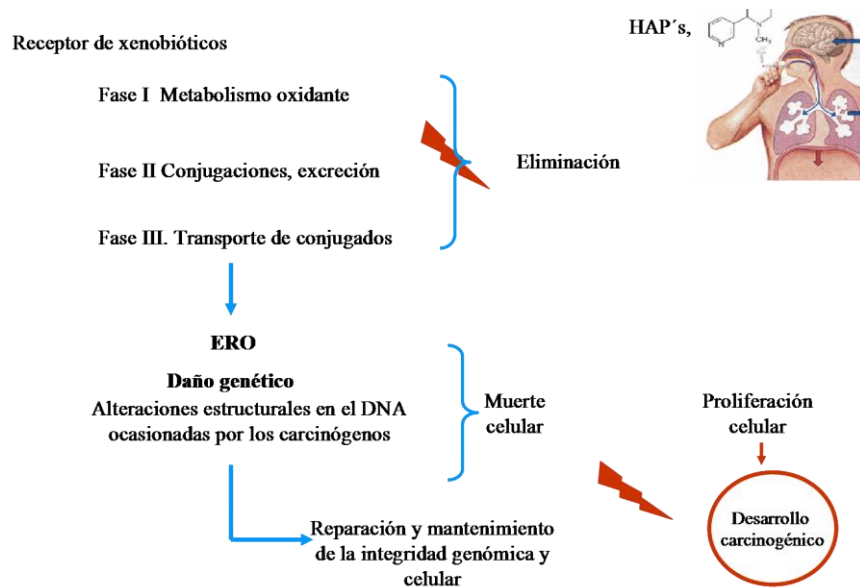


Figura 4.2. Enzimas del metabolismo primario y secundario de xenobioticos y el balance del estrés oxidante, así como las implicaciones de la generación de especies reactivas de oxígeno.

4.4. Análisis multidimensional del riesgo de cáncer pulmonar

Para corroborar los datos obtenidos anteriormente analizamos los datos con el software MDR 10.1, ya que el método tradicional para encontrar asociación entre variantes genéticas y el riesgo de cáncer es la regresión logística, que implica una hipótesis *a priori* y el MDR es un método estadístico libre que no implica hipótesis previas.

El Multi-Dimensionality Reduction (MDR) factors es un algoritmo matemático que realiza el modelaje de distintos factores y lo reduce a dos dimensiones, encontrando aquellas combinaciones que son más frecuentes en casos y los etiqueta como de *alto riesgo* y las combinaciones más frecuentes en controles las etiqueta como de *no riesgo*. El método consiste en aleatorizar los datos y encontrar modelos a través de cadenas de Markov, también realiza operaciones para probar la consistencia y la significancia de los modelos obtenidos, el diseño de MDR se muestra en la Fig. 4.3.

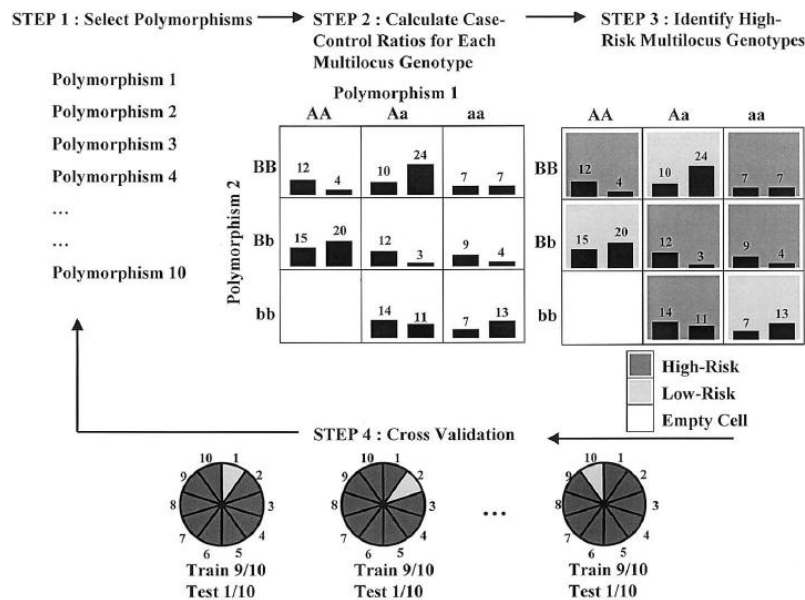


Fig. 4.3. Pasos involucrados en la implementación de MDR, donde además de polimorfismos se pueden modelar factores ambientales. Las celdas oscuras son las combinaciones de alto riesgo, las celdas claras de bajo riesgo y las blancas el empate entre casos y controles. Tomado de Ritchie et al, 2001.

En el modelo se introdujeron los 15 polimorfismos seleccionados, además de las variables de sexo y tabaquismo (la codificación de esta matriz se encuentra en el anexo).

Encontramos que los polimorfismos *CYP2E1*^{*5B}, *EPHX1*^{Tyr113His}, *CYP1A1*^{*2C}, *GSTP1*^{Ile105Val}, y *CCND1*^{G870A} son los que tienen un efecto importante en el riesgo de padecer cáncer pulmonar, donde además *CYP2E1*^{*5B} y *EPHX1*^{Tyr113His} presentan un efecto sinérgico (Fig. 4.4).

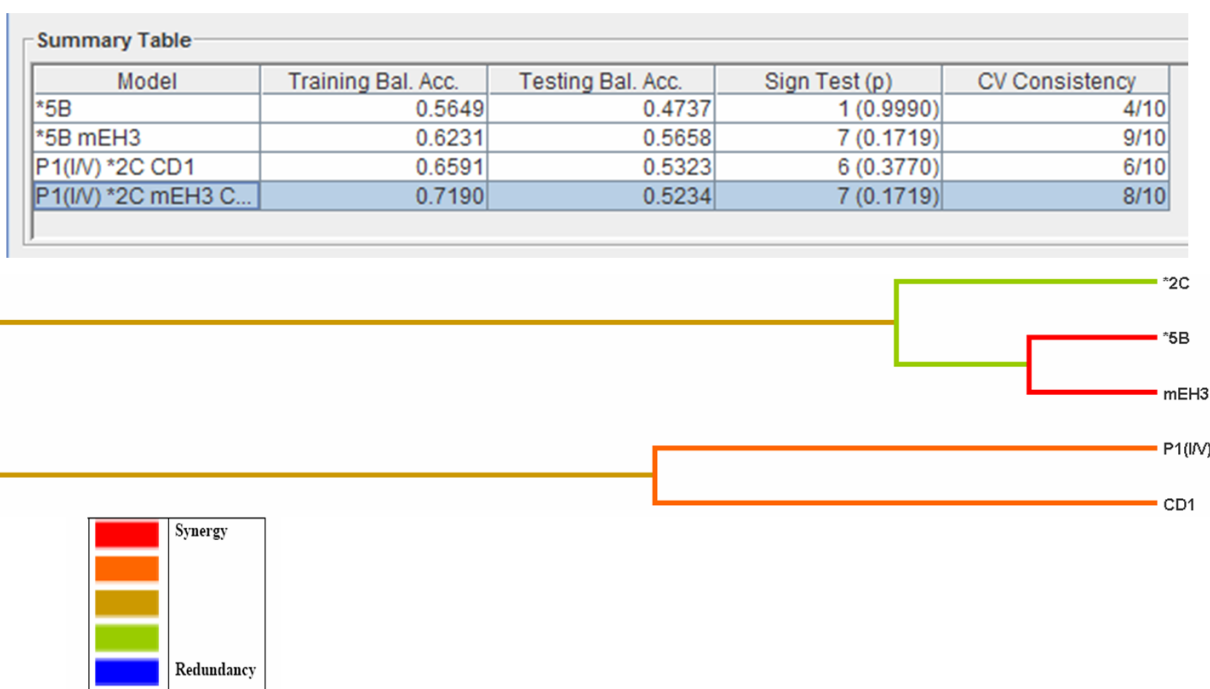


Fig. 4.4. Resumen de los modelos generados por MDR y el dendograma de las interacciones entre genes *2C = *CYP1A1*^{*2C}, *5B = *CYP2E1*^{*5B}, mEH3 = *EPHX1*^{Tyr113His}, P1(I/V) = *GSTP1*^{Ile105Val}, CD1 = *CCND1*^{G870A}.

La interacción *CYP2E1*^{*5B} y *EPHX1*^{Tyr113His} mostró una consistencia de 9/10, resultando ésta como la más importante entre casos y controles, seguida por *CYP1A1*^{*2C}, *GSTP1*^{Ile105Val} y *CCND1*^{G870A}, como se puede observar en la figura 4.5.

Se realizó un análisis removiendo el *CYP2E1*^{*5B} que fue el genotipo más importante en el estudio inicial y al realizar esta operación el *CYP1A1*^{*2C}, *MGMT*^{Leu84Phe} y *GSTP1*^{Ile105Val} fueron los más importantes del modelo, mientras que *EPHX1*^{Tyr113His} y *CCND1*^{G870A} resultaron redundantes, las *GST*'s *mu* y *theta* tomaron importancia al remover varios genotipos (datos no mostrados).

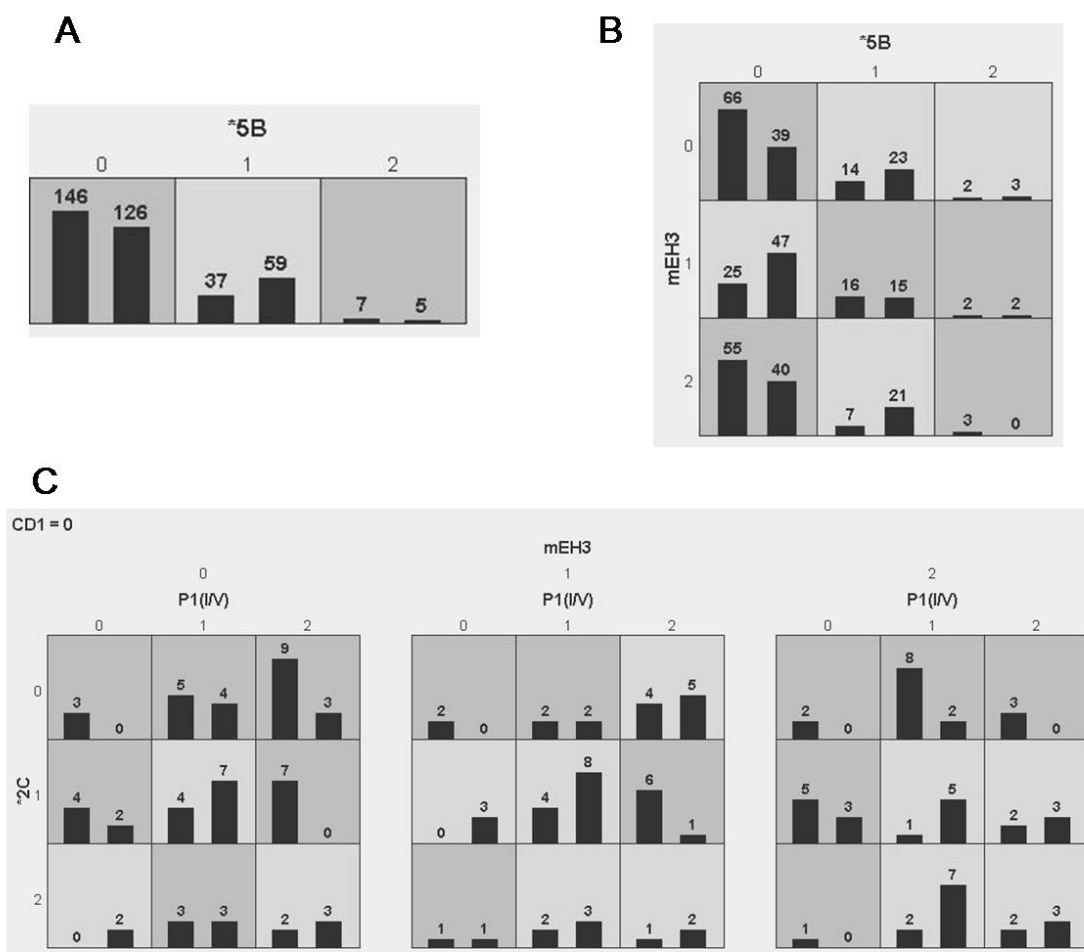


Fig. 4.5. Modelos generados por MDR, A) *CYP2E1*^{*5B} es el genotipo más importante con una consistencia (CV) de 4/10, el modelo presenta un OR de 1.91 (1.18-3.09) $X^2 = 7.10$ ($p = 0.007$). B) Interacción de *CYP2E1*^{*5B} y *EPHX1*^{Tyr113His} CV = 9/10, OR de 2.93 (1.86-4.61) $X^2 = 22.03$ ($p < 0.001$). C) Interacción *EPHX1*^{Tyr113His}, *CYP1A1*^{*2C}, *GSTP1*^{Ile105Val}, cuando *CCND1*^{G870A} = 0. CV = 8/10, OR de 6.65 (4.14-10.69) $X^2 = 66$ ($p < 0.001$).

* El 0 corresponde a los genotipos homocigos silvestres, 1 a los heterocigos y 2 a los genotipos homocigos polimorficos.

En los modelos generados por MDR se observa que los genotipos favorecidos (etiquetados como de no riesgo) corresponden preferentemente a los heterocigos, como también lo observamos en el análisis de regresión logística y aunque el MDR tiene la desventaja de que los OR se asignan por modelo y no por genotipo ó combinaciones específicas, nos da una idea más clara de las interacciones de riesgo más frecuentes en los casos.

En este análisis pudimos comprobar que aplicando otro modelo estadístico completamente distinto a la regresión logística los resultados son consistentes entre ambos modelos, por lo tanto podemos confiar en que nuestros resultados no son un artefacto estadístico, además de que la asignación de genotipos fue corroborada por análisis de secuenciación directa del DNA.

4.5. Análisis estratificado por tipo histológico de cáncer pulmonar.

El cáncer pulmonar se clasifica de acuerdo a sus características histo-patológicas y como observamos en el análisis de co-variables, entre los casos hay una agrupación de todos los casos de adenocarcinoma y en otro cluster se agrupan los demás tipos histológicos; en el primero la mayoría de los casos son mujeres no fumadoras y en el segundo son hombres fumadores.

Por otro lado, se han descrito spots mutacionales de p53 en individuos fumadores (Smith y cols., 2000), mientras que las mutaciones en adenocarcinoma (asociadas a no fumadores) son principalmente en EGFR (Ding y cols., 2008), lo que indica que la vía molecular que conduce al cáncer pulmonar es distinta entre fumadores y no fumadores (Choi y cols., 2007), donde además el tipo histológico también es afectado de forma distinta.

Debido a estas diferencias analizamos nuestros datos estratificando los casos por tipo histológico y encontramos que en el adenocarcinoma los genotipos Arg/Lys de *AhR*^{Arg554Lys}, T/C de *CYP1A1*^{*2A}, C/T de *CYP2E1*^{*5B} y A/A de *CCND1*^{G870A} son protectores, mientras que los genotipos Tyr/Tyr de *EPHX1*^{Tyr113His}, Arg/Arg de *EPHX1*^{His139Arg}, nulo de *GSTT1*, Val/Val de *GSTP1*^{Ile105Val}, Arg/Gln de *XRCC1*^{Arg399Gln} y Phe/Phe de *MGMT*^{Leu84Phe} resultaron de riesgo, aunque con valores de p no significativos (Tabla 4.7). Sin embargo, es interesante que las dos variantes de la epóxido hidrolasa

Tyr/Tyr 113 y Arg/Arg 139, que han sido correlacionadas con un incremento en la formación de aductos DNA-BPDE, sí resultaron de riesgo en los individuos que desarrollaron adenocarcinoma.

En el caso del cluster CCPEM (carcinoma de células pequeñas, epidermoide y mesotelioma) los genotipos Ile/Val de *CYP1A1*^{*2C} y Tyr/His de *EPHX1*^{Tyr113His} son protectores, además en los genes de fase II y de reparación la tendencia es similar a la encontrada en el análisis de todos los casos. Sin embargo, en estos casos el genotipo de ciclina D1 no presentó significancia estadística como genotipo protector y para p53 se observó un incremento no significativo en el riesgo de cáncer.

Es importante destacar que dos enzimas que han sido extensamente estudiadas en relación con la biotransformación del benzo[a]pireno, son protectoras en los tipos histológicos que se han correlacionado con tabaquismo, lo que apoya la hipótesis de la rápida metabolización y eliminación de los carcinógenos bioactivados, como conjugados con glutatión. A este respecto, es posible que el aumento en la tasa metabólica de los carcinógenos promueva que sean eliminados más rápidamente de la célula, reduciendo el tiempo de contacto entre las ROS y el DNA, de tal forma que la eliminación dependería de las GST's y aunque la frecuencia de los alelos de riesgo es relativamente alta: 20, 37 y 55 para *GSTT1*^{*0}, *GSTM1*^{*0} y *GSTP1*^{105Val} respectivamente, el fenotipo final depende de las combinaciones específicas de cada individuo.

Por otro lado, se ha documentado que el tabaquismo pasivo es un factor de riesgo muy importante para el desarrollo del cáncer pulmonar, y una explicación es que en los fumadores se activa el sistema de desintoxicación vía AhR, mientras que en los fumadores pasivos no ocurre esta respuesta, de modo que inhalan los mismos carcinógenos que los fumadores activos pero los metabolizan más lentamente (por los niveles basales de expresión de las enzimas de desintoxicación), por esta razón los productos carcinogénicos permanecen más tiempo en la célula favoreciendo la formación de aductos con el DNA, como lo demostró Gelhaus y cols., (2010) en células de epitelio pulmonar.

Tabla 4.7. Distribución de genotipos y OR del análisis estratificado por tipo histológico.

Genotipos	ADENOCARCINOMA			*CCPEM		
	* Odds Ratio	P [z]	I. Confianza	* Odds Ratio	P [z]	I. Confianza
<i>Ahr Arg/Arg</i>	1			1		
<i>Ahr Arg/Lys</i>	0.48	0.04	0.24 – 0.96	0.93	0.84	0.48 – 1.81
<i>Ahr Lys/Lys</i>	0.55	0.55	0.04 – 5.06	0.85	0.85	0.15 – 4.55
<i>CYP1A1*2A T/T</i>	1			1		
<i>CYP1A1*2A T/C</i>	0.53	0.03	0.30 – 0.94	0.77	0.44	0.40 – 1.48
<i>CYP1A1*2A C/C</i>	0.71	0.35	0.34 – 1.46	1.27	0.52	0.60 – 2.69
<i>CYP1A1*2C Ile/Ile</i>	1			1		
<i>CYP1A1*2C Ile/Val</i>	0.71	0.24	0.40 – 1.26	0.5	0.03	0.26 – 0.95
<i>CYP1A1*2C Val/Val</i>	0.81	0.56	0.41 – 1.62	0.6	0.17	0.29 – 1.25
<i>CYP1A1*4 Thr/Thr</i>	1			1		
<i>CYP1A1*4 Thr/Asn</i>	0.57	0.3	0.20 – 1.63	0.64	0.38	0.23 – 1.74
<i>CYP1A1*4 Asn/Asn</i>	2.27	0.42	0.30 – 17.1	0.86	0.91	0.06 – 12.2
<i>CYP2E1*5B C/C</i>	1			1		
<i>CYP2E1*5B C/T</i>	0.50	0.02	0.27 – 0.92	0.69	0.26	0.36 – 1.32
<i>CYP2E1*5B T/T</i>	0.53	0.47	0.09 – 2.92	1.38	0.64	0.34 – 5.50
<i>EPHX1 (113) Tyr/Tyr</i>	1.54	0.15	0.84 – 2.84	0.62	0.16	0.32 – 1.21
<i>EPHX1 (113) Tyr/His</i>	0.91	0.78	0.48 – 1.73	0.35	0.004	0.17 – 0.72
<i>EPHX1 (113) His/His</i>	1					
<i>EPHX1 (139) His/His</i>	1			1		
<i>EPHX1 (139) His/Arg</i>	0.41	0.09	0.14 – 1.16	0.71	0.48	0.27 – 1.82
<i>EPHX1 (139) Arg/Arg</i>	1.89	0.54	0.24 – 14.9			
<i>GSTM1</i>	1			1		
<i>GSTM1*0</i>	0.87	0.62	0.52 – 1.47	1.32	0.32	0.75 – 2.29
<i>GSTT1</i>	1			1		
<i>GSTT1*0</i>	1.44	0.21	0.80 – 2.58	1.23	0.51	0.65 – 2.34
<i>GSTP1 Ile/Ile</i>	1			1		
<i>GSTP1 Ile/Val</i>	0.80	0.5	0.42 – 1.52	1.32	0.41	0.66 – 2.63
<i>GSTP1 Val/Val</i>	1.37	0.34	0.71 – 2.64	1.24	0.58	0.56 – 2.73
<i>XRCC1 (399) Arg/Arg</i>	1			1		
<i>XRCC1 (399) Arg/Gln</i>	1.32	0.30	0.77 – 2.25	1.70	0.073	0.95 – 3.04
<i>XRCC1 (399) Gln/Gln</i>	0.75	0.56	0.29 – 1.94	0.49	0.22	0.15 – 1.52
<i>MGMT (84) Leu/Leu</i>	1			1		
<i>MGMT (84) Leu/Phe</i>	0.88	0.64	0.51 – 1.52	0.75	0.35	0.41 – 1.37
<i>MGMT (84) Phe/Phe</i>	1.53	0.26	0.72 – 3.23	0.99	0.99	0.41 – 2.40
<i>XPB (751) Lys/Lys</i>	1			1		
<i>XPB (751) Lys/Gln</i>	0.78	0.43	0.42 – 1.43	0.86	0.67	0.44 – 1.69
<i>XPB (751) Gln/Gln</i>	0.81	0.63	0.35 – 1.87	1.55	0.28	0.68 – 3.49
<i>CCND1 (870) G/G</i>	1			1		
<i>CCND1 (870) G/A</i>	0.84	0.54	0.5 – 1.44	0.85	0.60	0.46 – 1.55
<i>CCND1 (870) A/A</i>	0.32	0.01	0.13 – 0.80	0.77	0.53	0.34 – 1.73
<i>TP53 (72) Arg/Arg</i>	1			1		
<i>TP53 (72) Arg/Pro</i>	0.77	0.37	0.44 – 1.35	1.16	0.61	0.64 – 2.11
<i>TP53 (72) Pro/Pro</i>	0.88	0.75	0.41 – 1.88	1	0.99	0.43 – 2.32

* Carcinoma de células pequeñas, carcinoma epidermoide y mesotelioma.

4.6. Modelo poligénico-aditivo del cáncer pulmonar

El cáncer pulmonar es una enfermedad poligénica y multifactorial, por lo que abordamos su estudio bajo este enfoque integral, ya que en la mayoría de los estudios publicados se analizan polimorfismos en genes con función similar, sin tomar en cuenta las posibilidades que ofrece cada genotipo de conducir al desarrollo de la enfermedad, tal vez por eso existen resultados inconsistentes entre poblaciones. A este respecto tenemos dos teorías:

- Los polimorfismos por sí solos pueden no conferir susceptibilidad al cáncer pulmonar, ya que son de baja penetrancia, aunque su efecto en la susceptibilidad al cáncer pulmonar es muy pequeño puede ser aditivo.
- Los efectos de algunos polimorfismos pueden ser epistáticos sobre los efectos de los polimorfismos en otros genes, que también tienen implicaciones importantes en el desarrollo del cáncer pulmonar; ya que además de los genes implicados en la bioactivación de carcinógenos, hay que tomar en cuenta la desintoxicación de los metabolitos, la reparación del DNA y la dinámica del ciclo celular.

Analizamos los resultados bajo el modelo poligénico del cáncer como proponen Pharoah y cols., (2002) y Fletcher y cols., (2010). Incluimos sólo los genotipos de los polimorfismos *AhR*^{Arg554Lys}; *CYP1A1*^{*2A}, *CYP1A1*^{*2C}, *CYP2E1*^{*5B}, *EPHX1*^{Tyr113His}, *GSTP1*^{Ile105Val}, *XRCC1*^{Arg399Gln} y *CCND1*^{G870A} que fueron los que mostraron asociaciones significativas en algunos de los modelos antes probados (valores de $p \geq 0.2$). Los demás polimorfismos se descartaron porque tienen una frecuencia alélica muy baja, por no discriminar heterocigos de homocigos en el caso de las *GSTM1* y *GSTT1*, y por no encontrar consistencia o significancia estadística en alguno de los modelos antes probados.

Aunque al realizar las correcciones para comparaciones múltiples perdemos la significancia estadística a nivel 0.05, Wacholder y cols., (2004) y Selvin S. (1996) mencionan que es posible construir un modelo más cercano a la realidad analizando una mayor cantidad de variables y utilizar aquellas que presenten p - values ≥ 0.2 , priorizando los genes o polimorfismos que han sido apoyados por otras evidencias experimentales y/o epidemiológicas, por lo que utilizamos esta estrategia para construir el modelo poligénico.

El modelo se construyó asignando un valor de 0 a los genotipos homocigos que no confieren riesgo, 1 para los heterocigos y 2 para los genotipos homocigos que son denominados de *riesgo*. La codificación del riesgo de cada genotipo se asignó de acuerdo al valor de OR obtenido en los análisis univariados de regresión logística, los detalles de la codificación de esta matriz se encuentran en el anexo.

Los casos y controles presentan una distribución bimodal y se observa un ligero desplazamiento de los casos hacia la derecha, donde se encuentran los VRG más altos, el valor máximo y mínimo fue de 4 y 15 para casos y 4 y 14 para controles, con una media \pm sd de 9.87 (2.2) y 9.24 (2.06) respectivamente (Fig. 4.6). Se realizó una prueba no paramétrica para dos muestras independientes y encontramos diferencias significativas (Mann-Whitney =15024, $p=0.004$).

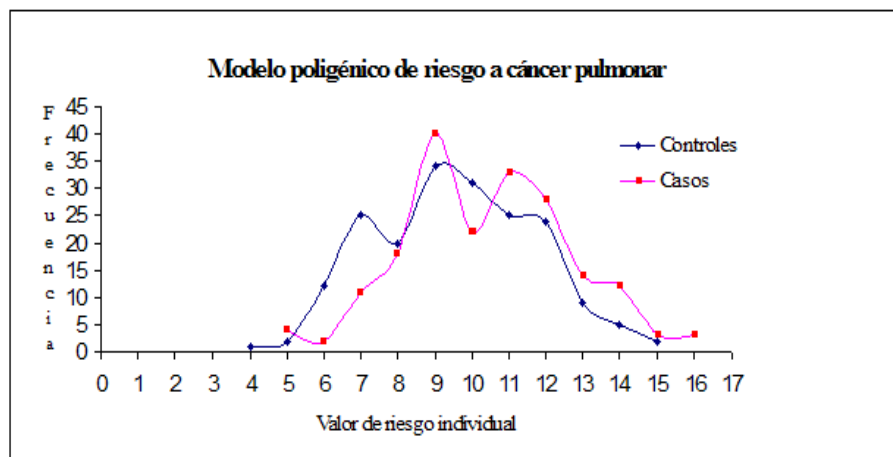


Fig. 4.6. Representación gráfica del modelo poligénico, basado en los genotipos de 8 genes y 2 variables importantes en el desarrollo del cáncer pulmonar. U de Mann-Whitney = 15024 ($p = 0.004$)

Los resultados indican que es factible que el riesgo de cada polimorfismo en genes de baja penetrancia sea aditivo y aunque el efecto de cada uno es pequeño la suma de ellos puede ser determinante en el desarrollo carcinogénico, en el que además el factor ambiental también juega un papel muy importante, como lo observamos en el análisis estratificado por tipo histológico de cáncer.

El análisis poligénico es una aproximación más real de la susceptibilidad genética - ambiental de los individuos hacia el desarrollo de una enfermedad tan compleja como lo es el cáncer pulmonar. Sin embargo, para llegar a la construcción de este modelo es necesario definir si los genotipos analizados confieren riesgo o protección en la población analizada, ya que la variabilidad genética entre poblaciones impide extrapolar los resultados de una población a otra, como lo demostramos en este estudio.

Algunos polimorfismos que habían sido considerados como de riesgo para otras poblaciones, en nuestra población de estudio resultaron protectores, aunque algunas diferencias fueron poco significativas utilizando los análisis univariados y bivariados. Sin embargo, al analizar la suma de cada variante de riesgo en un mismo individuo, la susceptibilidad incrementa significativamente en los casos y además podemos observar que en los casos el número de individuos con valores de VRG mayores a 11 incrementan, mientras que en los controles disminuyen.

El modelo poligénico permite observar las diferencias específicas de los genotipos de riesgo presentes en cada individuo y puede corregir las limitantes de otros modelos que no toman en cuenta el efecto sinérgico, hipostático y epistático que pueden tener unos genotipos sobre otros, ya que un individuo que tiene variantes de riesgo en el metabolismo primario pero no tiene riesgo en genes de reparación y del ciclo celular y si además no fuma, tendrá menos riesgo de desarrollar cáncer pulmonar, mientras que un individuo que no presenta polimorfismos de riesgo en metabolismo primario, pero sí de reparación, de ciclo celular y presenta tabaquismo intenso, entonces su riesgo aumentará progresivamente; esto se verá reflejado en el VRG de cada individuo dependiendo de sus genotipos, de su estilo de vida y de su edad. Sin embargo, es necesario comprobar experimentalmente esta hipótesis, para ello realizamos un estudio piloto que se describirá más adelante.

4.7 Modelo predictivo de regresión logística

Para este análisis se utilizaron los dos agrupamientos que obtuvimos anteriormente en el análisis multivariado de variables y covariables (grupo 1 adenocarcinoma (AC) y grupo 2 carcinoma de células pequeñas, epidermoide y mesotelioma (CCPEM)). Como se mencionó anteriormente, las variables que difieren significativamente son sexo ($p > 0.001$), tabaquismo ($p > 0.001$) y exposición a asbestos ($p > 0.001$), siendo el AC más frecuente en mujeres no fumadoras, mientras que el CCPEM es más frecuente en hombres fumadores; además el mesotelioma también correlaciona significativamente con el tabaquismo y la exposición a asbestos, en hombres.

Con base en estos resultados utilizamos los dos grupos para modelar las probabilidades de ser caso y tener algún tipo específico de cáncer, tomando en cuenta el componente genético de los individuos (VRG) y ajustando el modelo por edad, sexo e índice tabaquico.

La probabilidad de ser caso para cualquier tipo histológico de cáncer pulmonar (AC, carcinoma de células pequeñas, carcinoma epidermoide y mesotelioma) es diferente en hombres y mujeres. En los hombres los IT son más altos con respecto a las mujeres y a partir del $IT \leq 50$ la probabilidad aumenta a $< 70\%$ independientemente del valor de VRG, mientras que en las mujeres las probabilidades de ser caso son $< 70\%$ teniendo ITs < 40 , en estos casos parece haber más susceptibilidad en VRG a partir de 8, aunque sean fumadoras ligth (> 5 cpd) o no fumadoras (Fig. 4.7A).

Al estratificar en el grupo 1 al AC y en el grupo 2 a los tipos histológicos CCPEM encontramos que las gráficas siguen teniendo un comportamiento diferente en hombres y mujeres. En el grupo 1 (AC) las mujeres presentan mayor riesgo (40-50%) si son fumadoras y tienen VRG > 7 , sin embargo también existe una probabilidad de desarrollar AC si tienen VRG < 8 , aunque sean fumadoras light o no fumadoras. En los hombres, la gráfica es más heterogénea y las probabilidades disminuyen con respecto a las mujeres, van de 10 a 27% y se observa que los que tienen alta probabilidad de desarrollar AC son aquellos que tienen VRG > 7 y son fumadores con IT < 30 . También son susceptibles al AC algunos hombres no fumadores o fumadores ligth con VRG < 8 (Fig. 4.7B).

En el grupo 2 (CCPEM) existe una alta probabilidad (< a 50%) de desarrollar alguno de estos tipos histológicos en hombres, si el IT es \leq a 50 y también existe mayor susceptibilidad en los individuos con VRG \leq a 9. En las mujeres encontramos probabilidades de 40-50% en fumadoras con VRG \geq 4 a 11, mientras que en las fumadoras con IT > 20 y cualquier VRG tienen bajas probabilidades de padecer de CCPEM (Fig. 4.7C)

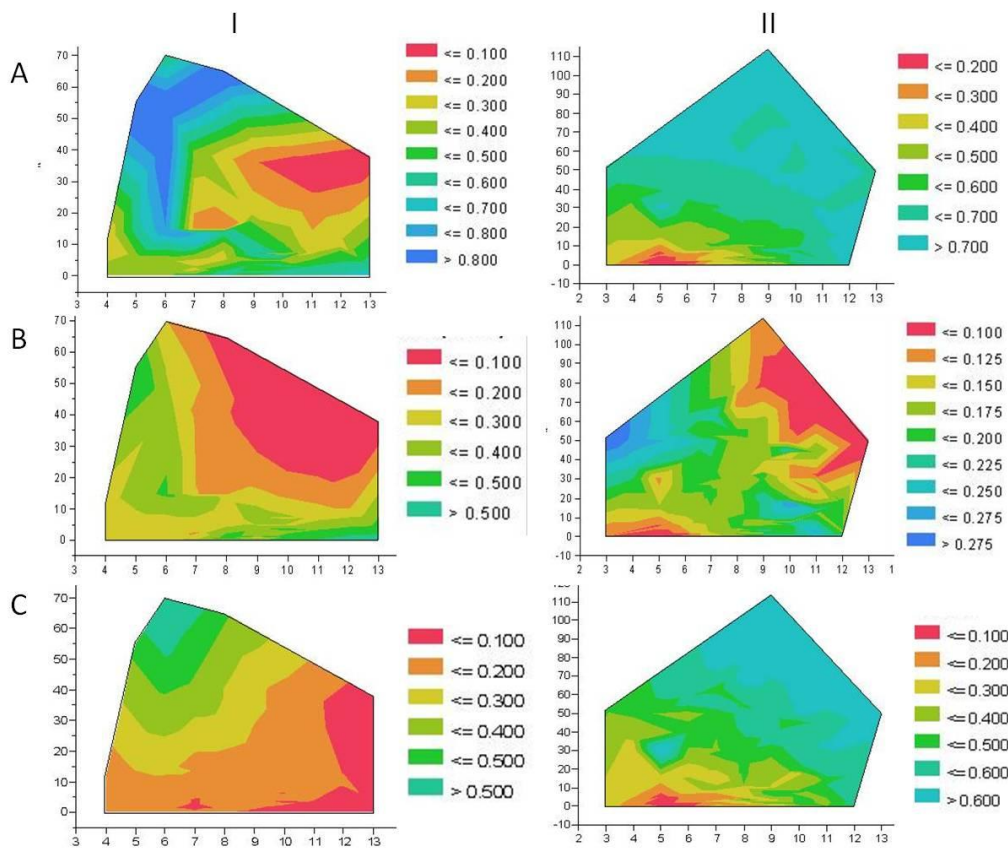


Figura 4.7 Modelo de regresión logística multivariado. El modelo incluye los valores de VRG en el eje X y la intensidad del tabaquismo en el eje Y. A) Probabilidad de ser caso con cualquier tipo histológico (AC o CCPEM, I en mujeres y II en hombres. B) Probabilidad de tener AC, I en mujeres y II en hombres. C) Probabilidad de tener CCPEM, I en mujeres y II en hombres.

Se realizó la correlación entre los datos actuales y las probabilidades del modelo de regresión logística, y encontramos que en la probabilidad de ser caso hay un desajuste ($R^2=0.87$, $p=0.06$) que puede ser debido a la heterogeneidad de los datos, ya que aquí se incluyen todos los tipos histológicos de cáncer pulmonar. Al estratificar en adenocarcinoma ($R^2=0.97$, $p=0.02$) y CCPEM ($R^2=0.99$, $p=0.01$) encontramos que los datos experimentales se ajustan con las probabilidades del modelo logístico (Fig. 4.8), lo que indica que es posible modelar el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar tomando en cuenta las características genéticas de los individuos, el sexo, la edad y el estatus de tabaquismo.

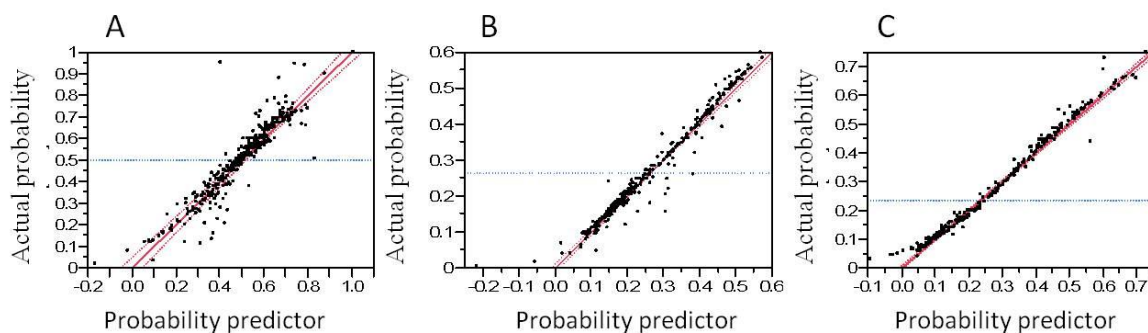


Figura 4.8. Ajuste del modelo de regresión logística. A) Probabilidad actual de ser caso vs probabilidad predictiva. Se incluyen todos los tipos histológicos AC y CCPEM, en hombres y mujeres. $R^2=0.87$, $p=0.06$. B) Probabilidad actual de tener AC vs probabilidad predictiva. $R^2=0.97$, $p=0.02$. C) Probabilidad actual de tener CCPEM vs probabilidad predictiva. $R^2=0.99$, $p=0.01$.

4.8. Análisis de expresión génica en respuesta a NNK y B[a]P

Con base en los resultados anteriores y en lo que se ha reportado en la literatura, planteamos la hipótesis de que los individuos portadores de genotipos de riesgo podrían ser más susceptibles a los efectos carcinogénicos, causados por la exposición a agentes genotóxicos, y que dicha susceptibilidad es dependiente de los genotipos de riesgo que posea el individuo, así como de los factores ambientales a los que está expuesto, en este caso al tabaquismo.

Para comprobar lo anterior identificamos dos individuos con distintos perfiles de riesgo, uno denominado de alto riesgo (CGR) y otro denominado de bajo riesgo (SGR), se obtuvo una muestra sanguínea de cada uno de ellos y se cultivaron los linfocitos, en los cuales se llevaron a cabo ensayos de genotoxicidad para determinar si existe una correlación entre la expresión de los genes *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1*, sus genotipos de riesgo y el daño genético.

Ambos individuos son hombres, fumadores esporádicos de la misma edad y con características físicas y estilos de vida similares, esto para minimizar la variabilidad debida a otros factores extrínsecos que no podemos controlar. Además se les solicitó que una semana antes de la toma de muestra disminuyeran la dieta rica en grasas y carbohidratos para que la muestra pudiera ser procesada con la menor cantidad de estos componentes presentes en la sangre.

Para el ensayo de genotoxicidad utilizamos el benzo[a]pireno y la 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) que son dos carcinógenos presentes en el humo del tabaco, las concentraciones fueron de 2 μ M, 4 μ M y 6 μ M de benzo[a]pireno (B[a]P), así como 0.24mM, 0.48mM y 0.96mM de NNK (Figura 4.9). Se observó que las células sobreviven a las dosis de carcinógenos administrados y además se produce daño genético, este último fue verificado en las metafases preparadas a partir de estos cultivos (dato no mostrado).

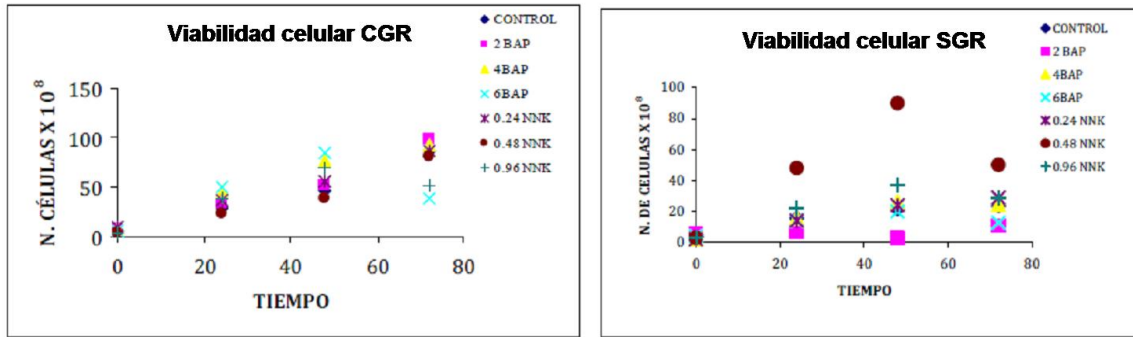


Figura 4.9. Análisis de viabilidad celular en linfocitos de individuos tratados con distintas dosis de B[a]P y NNK (CGR individuo con más genotipos de riesgo, SGR individuo con menos genotipos de riesgo)

También analizamos la expresión génica de *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTT1* y *GSTP1* en los linfocitos de los dos individuos seleccionados. En la Figura 4.10 se observan los resultados del RT-PCR, donde muestran las curvas de ciclos que fueron utilizadas para el PCR semicuantitativo.

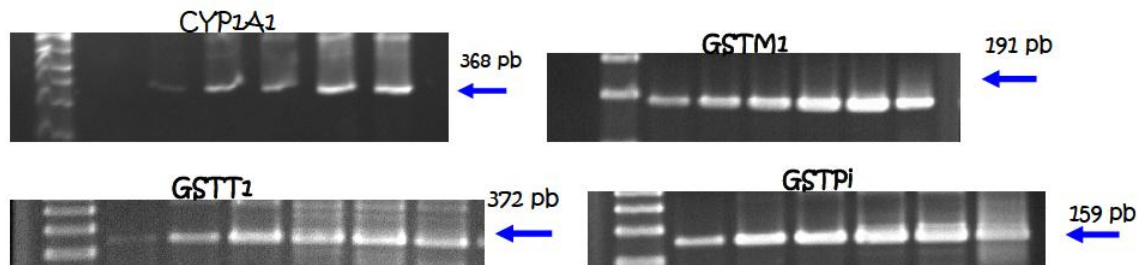
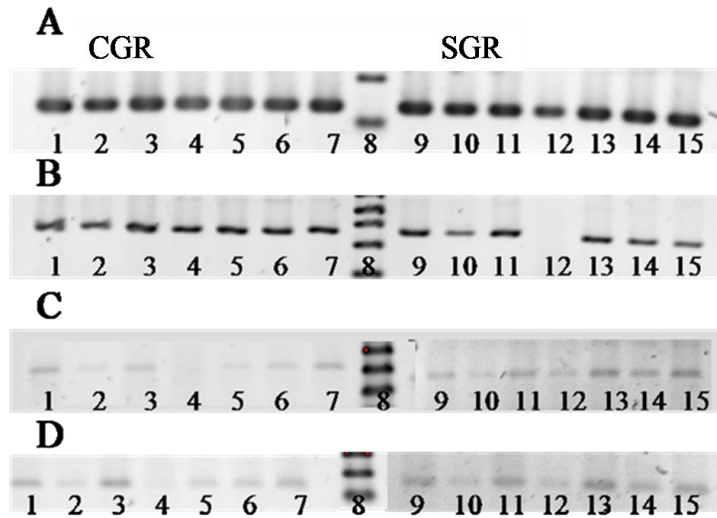


Figura 4.10. Ciclos de PCR realizados en el cDNA control del individuo CGR para establecer las condiciones de amplificación de los ensayos posteriores.

Encontramos aparentes diferencias en la expresión entre individuos y tratamientos (Figura 4.11), en el individuo CGR la *GSTM1* no se expresa ya que presenta el polimorfismo nulo que impide la expresión de la enzima, no obstante es necesario realizar más experimentos que sean concluyentes.



A) GAPDH, B) CYP1A1, C) GSTT1 y D) GSTPL

CGR (Individuo con genotipos de riesgo SGR (individuo sin genotipos de riesgo)

Carriles: 1 Controles, Carriles 2-4: 2, 4 y 6 μ M de B[a]P, Carriles 5-7: 0.24, 0.48 y 0.96 mM NNK. Carril 8: Marcador peso molecular. Carril 9: Controles, Carriles 10-12: 2, 4 y 6 μ M de B[a]P, Carriles 13-15: 0.24, 0.48 y 0.96 mM NNK.

Figura 4.11 Perfiles de expresión génica en respuesta a B[a]P y NNK.

Consideramos necesario realizar ensayos más finos y detallados, ya que los resultados obtenidos en este trabajo sólo son preliminares. Además es necesario determinar si en los distintos individuos sometidos al mismo tratamiento existen diferencias en la cantidad de aductos generados y en la cantidad de aberraciones cromosómicas. Finalmente, es necesario determinar si los resultados correlacionan con el nivel de susceptibilidad genética individual.

CAPÍTULO V

5.1 Conclusiones

En la primera parte del estudio analizamos la frecuencia de los polimorfismos seleccionados y se observó que todos los genotipos se encuentran bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg.

El polimorfismo *CYP1A1*^{*3} presenta una frecuencia menor al 1% en población Mestiza Mexicana, por lo que fue eliminado de los análisis posteriores.

Los análisis de ligamiento genético muestran que los polimorfismos de *CYP1A1*^{*2A} y *CYP1A1*^{*2C} no se encuentran ligados, aunque ambos polimorfismos son cercanos y presentan frecuencias altas de 0.49 y 0.59 respectivamente. En el caso de los polimorfismos *EPHX1*^{Tyr113His} y *EPHX1*^{His139Arg} tampoco se encuentran ligados, lo que indica que el haplotipo de alta actividad y el de baja actividad no existen en el mismo individuo, no obstante la frecuencia de *EPHX1*^{His139Arg} fue muy baja (0.054) con respecto a la de *EPHX1*^{Tyr113His} (0.51). Además el dendograma basado en las frecuencias genotípicas de los individuos confirma la hipótesis de que los polimorfismos *CYP1A1*^{*2A} y *CYP1A1*^{*2C} y *EPHX1*^{Tyr113His} y *EPHX1*^{His139Arg} no se encuentran ligados (*Resultados reportados en el manuscrito*).

El análisis de cluster y conglomerados discriminó seis grupos que muestran la heterogeneidad genética, los grupos 1 y 6 contienen la mayor parte de la muestra, 124 y 150 individuos respectivamente, sin embargo en éstos no se observa sobre-representación de genotipos de riesgo.

En el modelo poligénico fue posible encontrar individuos con distintos niveles de susceptibilidad, a diferencia del análisis de conglomerados, lo que indicaría que individuos con altos VGRs tendrían mayor susceptibilidad genética de padecer de cáncer pulmonar (*Resultados reportados en el manuscrito*).

El análisis multivariado basado en covariables pudo distinguir dos grupos: uno que incluye todos los casos de adenocarcinoma y otro que incluye los otros tres tipos histológicos. Las variables que difieren significativamente entre grupos son: sexo, tabaquismo y exposición a asbestos. En este análisis se observó que el adenocarcinoma se presenta principalmente en mujeres no fumadoras,

mientras que el carcinoma epidermoide, el de células pequeñas y el mesotelioma se presenta en hombres fumadores, y además el mesotelioma se encuentra relacionado con la exposición a asbestos.

En los análisis de regresión logística los genotipos *CYP1A1*^{*2C} *Ile/Val*, *CYP2E1*^{*5B} *C/T*, *EPHX1*^{Tyr113His} *Tyr/His* y *CCND1*^{G870A} *A/A* mostraron un efecto protector (OR inferiores a 1, $p > 0.05$), mientras que el polimorfismo *XRCC1*^{Arg399Gln}, genotipo *Arg/Gln* mostró un incremento del riesgo, con un OR de 1.54 ($p = 0.06$, marginalmente significativo). El efecto protector de las variantes polimórficas que encontramos en nuestro estudio y que habían sido consideradas de riesgo en otras poblaciones, podría ser debido al incremento en la tasa de metabolización que causan los polimorfismos estudiados en los genes *CYP1A1*, *CYP2E1* y *EPHX1* que son activados vía Ahr, de tal forma que las enzimas codificadas activarían pro-carcinógenos más rápidamente y los metabolitos reactivos permanecerían menos tiempo en la célula al ser eliminados como conjugados con glutatión.

En el caso de los genes de reparación sólo se encontró un incremento del riesgo, marginalmente significativo, en portadores del genotipo *XRCC1*^{Arg399Gln}, posiblemente la falta de asociación entre las variantes de genes de reparación sea debida al efecto protector de los genes del metabolismo primario y secundario, ya que los genotipos *MGMT*^{84Phe} y *XPB*^{751Gln} incrementan el riesgo, aunque de forma no significativa, además el estrés oxidante que daña al DNA y que debe ser reparado por las enzimas de reparación, depende del balance entre la actividad y expresión de las enzimas de los metabolismos primario y secundario.

En los genes de proteínas del ciclo celular el genotipo *CCND1*^{870A} mostró un efecto protector, mientras que en los genotipos de p53 no encontramos ninguna asociación con cáncer pulmonar.

El análisis MDR indica que los polimorfismos *CYP2E1*^{*5B}, *EPHX1*^{Tyr113His}, *CYP1A1*^{*2C}, *GSTP1*^{Ile105Val}, y *CCND1*^{G870A} son los que tienen un efecto importante en el riesgo a padecer cáncer pulmonar, donde además los genotipos *CYP2E1*^{*5B} y *EPHX1*^{Tyr113His} presentan un efecto sinérgico. En los modelos generados por MDR se observa que los genotipos favorecidos (etiquetados como de no riesgo) corresponden preferentemente a los heterocigos, como también lo observamos en el análisis de

regresión logística, así pudimos comprobar que aplicando otro modelo estadístico completamente distinto a la regresión logística, los resultados son consistentes entre ambos métodos estadísticos.

El análisis estratificado por tipo histológico mostro que en el adenocarcinoma los genotipos Arg/Lys de *AhR*^{Arg554Lys}, T/C de *CYP1A1*^{*2A}, C/T de *CYP2E1*^{*5B} y A/A *CCND1*^{G870A} son protectores, mientras que los genotipos Tyr/Tyr de *EPHX1*^{Tyr113His}, Arg/Arg de *EPHX1*^{His139Arg}, nulo de *GSTT1*, Val/Val de *GSTP1*^{Ile105Val}, Arg/Gln de *XRCC1*^{Arg399Gln} y Phe/Phe de *MGMT*^{Leu84Phe} resultaron de riesgo, aunque con valores de *p* no significativos. En el caso del cluster CCPEM los genotipos Ile/Val de *CYP1A1*^{*2C} y Tyr/His de *EPHX1*^{Tyr113His} son protectores, sin embargo en estos casos el genotipo de ciclina D1 no presentó significancia estadística como protector y en p53 se observó un incremento no significativo en el riesgo a cáncer.

El modelo poligénico de casos y controles mostró que las dos poblaciones se distribuyen como la curva normal, aunque en los casos la distribución es más irregular las diferencias entre ambas muestras fueron significativas (U de Mann-Whitney = 15024 *p* = 0.004), estos resultados sugieren que es factible que el riesgo atribuido a los factores genéticos sea aditivo y el resultado final puede depender del tipo y número de polimorfismos de riesgo que posee cada individuo, además de que este riesgo puede incrementar con la edad y con el nivel de tabaquismo.

En los análisis *in vitro* sólo pudimos observar que los genes que nos interesan se expresan en linfocitos humanos y que podría existir una modulación dependiente de los tratamientos con B[a]P y NNK, entre individuos, sin embargo es necesario realizar más experimentos que sean concluyentes.

5.2 Perspectivas

- Es necesario ampliar el tamaño muestral para determinar si los genotipos que resultaron poco significativos adquieren significancia y si se reproduce el efecto protector que encontramos en nuestro estudio. Además de incrementar el tamaño de muestra sería conveniente incluir otros genes candidatos, esto con el fin de comprobar si la curva de casos del modelo poligénico se sigue desplazando hacia los valores más altos de VRG, lo cual comprobaría que el efecto pequeño de cada genotipo de riesgo es aditivo.
- Para lograr el objetivo anterior es necesario incluir técnicas de genotipificación masiva, actualmente existen compañías que ofrecen microarreglos supervisados con etiquetas de interés y para este fin considero que sería más conveniente seleccionar etiquetas de genes candidatos, que realizar un análisis de todo el genoma (GWAS).
- Una vez obtenidos estos datos se podrían incluir en un modelo matemático para predecir el riesgo de un individuo que posee ciertas características genéticas y tiene otros factores de riesgo ambientales relacionados con el estilo de vida y/o laborales.
- Por otro lado, sería interesante realizar réplicas de este estudio en muestras de Mestizos Mexicanos de las regiones norte y sur del país, ya que en el presente estudio se incluyeron mayoritariamente individuos de la zona centro, esto permitiría determinar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en este estudio y/o identificar diferencias genéticas entre individuos de distintas zonas del país.
- En los análisis *in vitro* es necesario realizar más ensayos que permitan determinar si existen diferencias en la expresión de los genes de interés y los distintos tratamientos, además dilucidar si esas diferencias dependen de la carga genética de los individuos.
- Es importante concluir la caracterización del efecto de los tratamientos con carcinógenos, a través de biomarcadores de cáncer, como son los aductos con el DNA y las aberraciones cromosómicas, así como su correlación con el VRG.

- Por otro lado, también es necesario tomar en cuenta el órgano blanco, en este caso el pulmón, ya que como lo reportó Gelhaus (2010), existen diferencias tanto de expresión génica como de efecto entre los distintos órganos y tejidos, por lo que realizar análisis en células pulmonares de individuos con altos valores de VRG y de individuos con bajos valores de VRG podría ayudar a dilucidar los efectos y mecanismos de la susceptibilidad genética hacia el cáncer pulmonar, en el órgano blanco, no obstante una limitante es la obtención de las muestras, las cuales tendrían que ser de cirugías en pulmones sanos.
- Además se podría analizar el nivel de aductos en el DNA de casos (sin tratamiento de quimio/radioterapia) y compararlo con el nivel de aductos de los controles, para determinar si efectivamente los casos presentan mayor daño genético que potencialmente los pudo haber conducido al desarrollo del cáncer, además esto permitiría determinar si existe correlación entre los aductos con el DNA y los genotipos de riesgo.
- También se podría utilizar el presente estudio como una referencia para comparar con otro grupo de pacientes diagnosticados con EPOC, ya que sería muy interesante determinar si existen diferencias genéticas entre ambas poblaciones de casos, ya que las dos enfermedades tienen como principal factor etiológico el tabaquismo, sin embargo el cáncer pulmonar es una enfermedad proliferativa, mientras que las EPOC son enfermedades inflamatorias crónicas.
- Por otro lado, resulta atractivo analizar los polimorfismos del receptor *CHRNA* que han sido asociados con la adicción a la nicotina y determinar si entre los pacientes con cáncer pulmonar y EPOC existe una sobre-representación de los genotipos de riesgo de dicho gen.

ANEXO I

Codificación de matrices

Matriz 1. Codificación de las matrices para la regresión logística, el modelo poligénico (en individuos sanos) y el modelo estocástico.

N.	Gen/Polimorfismo	Reference	0	1	2	*Alelo riesgo	**Alelo referencia
		SNP (rs)					
1	AhR ^{Arg554Lys}	2066853	Arg/Arg	Arg/Lys	Lys/Lys	Lys	Arg
2	CYP1A1 ^{*2A}	4646903	T/T	T/C	C/C	C	T
3	CYP1A1 ^{*2C}	1048943	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Val	Ile
4	CYP1A1 ^{*4}	1799814	Thr/Thr	Thr/Asn	Asn/Asn	Asn	Thr
5	CYP2E1 ^{*5B}	2031920	C/C	C/T	T/T	T	C
6	EPHX1 ^{Tyr113His}	1051740	His/His	His/Tyr	Tyr/Tyr	Tyr	Tyr
7	EPHX1 ^{His139Arg}	2234922	His/His	His/Arg	Arg/Arg	Arg	His
8	GSTM1 ^{*0}	Delección	Nulo	ND*	Positivo	Nulo	Positivo
9	GSTT1 ^{*0}	Delección	Nulo	ND*	Positivo	Nulo	Positivo
10	GSTP1 ^{Ile105Val}	947894	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Val	Ile
11	XRCC1 ^{Arg399Gln}	25487	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Gln	Arg
12	XPD ^{Lys751Gln}	13181	Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln	Gln	Lys
13	MGMT ^{Leu84Phe}	12917	Leu/Leu	Leu/Phe	Phe/Phe	Phe	Leu
14	CCND1 ^{G870A}	603965	G/G	G/A	A/A	A	G
15	TP53 ^{Arg72Pro}	1042522	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Pro	Arg

* Alelo de riesgo reportado en la literatura

** Alelo de referencia utilizado en los análisis de regresión logística

Matriz 2. Codificación utilizada en el modelo de regresión logística de casos y controles

N.	Gen/Polimorfismo	0*	1*	2*	**Alelo riesgo
1	AhR ^{Arg554Lys}	Lys/Lys	Arg/Lys	Arg/Arg	Arg
2	CYP1A1 ^{*2A}	C/C	T/C	T/T	T
3	CYP1A1 ^{*2C}	Val/Val	Ile/Val	Ile/Ile	Ile
4	CYP2E1 ^{*5B}	T/T	C/T	C/C	C
5	EPHX1 ^{Tyr113His}	Tyr/Tyr	His/Tyr	His/His	His
6	GSTP1 ^{Ile105Val}	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Val
7	XRCC1 ^{Arg399Gln}	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	Gln
8	CCND1 ^{G870A}	A/A	G/A	G/G	G

* Valor asignado según genotipo

** Alelo de riesgo según análisis de casos y controles de este estudio

ANEXO II.

Aprobación del Comité de Bioética



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
APARTADO POSTAL 70220
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MÉXICO, D. F.

DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN
Investigador Asociado "C"
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Estimada Dra. Rubio:

La Comisión de Bioética para Investigaciones en Humanos del Instituto de Investigaciones Biomédicas revisó el proyecto de investigación "IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL A CÁNCER PULMONAR" que nos ha enviado para su evaluación. De acuerdo a nuestro Código Ético para el Personal Académico, este proyecto cae dentro de la categoría de los proyectos que no requieren de una revisión exhaustiva por no implicar riesgo alguno para los participantes. Por lo anterior esta Comisión emite un dictamen **aprobatorio**, a reserva de que se realicen los ajustes necesarios en la carta de consentimiento informado para que cumpla con lo establecido por la Ley General de Salud.

ATENTAMENTE,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, a 7 de agosto de 2009.
POR LA COMISIÓN



DR. SIMÓN KAWA

C.c.p. Archivo

Bibliografia

- Abdel-Aziz HO, Takasaki I, Tabuchi Y, Nomoto K, Murai Y, Tsuneyama K, Takano Y. High-density oligonucleotide microarrays and functional network analysis reveal extended lung carcinogenesis pathway maps and multiple interacting genes in NNK [4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyle)-1-butanone] induced CD1 mouse lung tumor. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2007**; 133: 107-115.
- Abdel-Rahman SZ, El-Zein R, Anwar W. and Au W. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett*. **1996**; 107: 229-233.
- ^a Abdel-Rahman SZ, Salama SA, Au WW, Hamada FA. Role of polymorphic CYP2E1 and CYP2D6 genes in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes. *Pharmacogenetics*. **2000**; 10(3): 239-249.
- ^b Abdel-Rahman SZ. and El-Zein R. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett*. **2000**; 159: 63-71.
- Affato A, Wolfe K, Lopez M, Hallberg C, Ammenheuser M, Abdel-Rahman. Effect of XPD/ERCC2 polymorphisms on chromosome aberration frequencies in smokers and on sensitivity to the mutagenic tobacco-specific nitrosamine NNK. *Environ Mol Mutagenesis*. **2004**; 44: 65-73.
- Alexandrov K, Cascorbi I, Rojas M, Bouvier G, Kriek E, Bartsch H. CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers lung: comparison with aromatic/hydrofobic adduct formation. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1969-1977.
- Anisimov VN. Biology of aging and cancer. *Cancer Control*. **2007**; 14(1): 23-31.
- Anzenbacher and Anzenbacherová. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *CMLS, Cell Mol Life Sc*. **2001**; 58: 737-747.
- Baida A. Factores genéticos de susceptibilidad al cáncer de tiroides y riesgo genético del tratamiento con ¹³¹I. Tesis doctoral. Facultat de Ciències. Departament de Genètica I Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. **2006**.
- Balmain A, Gray J, Ponder B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet*. **2003**; 33: 238-244.
- Brockmüller J, Cascorbi I, Henning S, Meisel C, and Roots I. Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology*. **2000**; 61: 212-227.
- Bugni J, Han J, Tsai M, Hunter D, Samson L. Genetic association and functional studies of major polymorphic variants of MGMT. *DNA Repair* **2007**; 6: 1116-1126.
- Cascorbi I, Brockmüller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res*. **1996**; 4965-4969.

- Castorena-Torres F, Mendoza-Cantú A, de León MB, Cisneros B, Zapata-Pérez O, López-Carrillo L, Salinas JE, Albores A. CYP1A2 phenotype and genotype in a population from the Carboniferous Region of Coahuila, Mexico. *Toxicol Lett.* **2005**; 156(3): 331-339.
- Celius T and Matthews J. Functional analysis of six human aryl hydrocarbon receptor variants in human breast cancer and mouse hepatoma cell lines. *Toxicol.* **2010**; 277: 59-65.
- Chaouachi K. Hookah (Shisha, Narghile) Smoking and Environmental tobacco smoke (ETS). A critical review of the relevant literature and the public health consequences. *Int J Environ Res Pub Health* **2009**; 6: 798-843.
- Chen D, Tian T, Wang H, Liu H, Hu Z, Wang Y, Liu Y, Ma H, Fan W, Miao R, Sun W, Wang Y, Qian J, Jin L, Wei Q, Shen H, Huang W, Lu D. Association of human aryl hydrocarbon receptor gene polymorphisms with risk of lung cancer among cigarette smokers in a Chinese population. *Pharmacogenet Genomics.* **2009**; 19(1): 25-34.
- Choi JE, Park SH, Kim KM, Lee WK, Kam S, Cha SI, Kim CH. Polymorphisms in the epidermal growth factor receptor gene and the risk of primary lung cancer: a case-control study. *BMC Cancer* **2007**; 7: 199-208.
- Costopoulou D, Vassiliadou I, Papadopoulos A, Makropoulos V, Leondiadis L. Levels of dioxins, furans and PCBs in human serum and milk of people living in Greece. *Chemosphere* **2006**; 65(9): 1462-1469.
- Crofts F, Cosma G, Currie D, Taioli E, Toniolo P, Garte S. A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis* **1993**; 14: 1729-1731.
- Dagher Z, Garçon G, Billet S, Gosset P, Ledoux F, Courcot D, Aboukais A, Shirali P. Activation of different pathways of apoptosis by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol.* 2006; 225(1): 12-24.
- Dickinson TR. Química: Enfoque Ecológico. Ed. Limusa. **1992**. México
- Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, Sougnez C, Greulich H, Muzny DM. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* **2008**; 455: 1069-1075.
- Dong L, Potter J, White E, Ulrich C, Cardon L. and Peters U. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphism in candidate genes. *JAMA* **2008**; 299: 2423-2434.
- Duell E, Wiencke J, Chen T, Varconyi A, Zuo Z, Ashok S, Mark E, Wain J, Cristiani D, Kelsey K. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* **2000**; 21(5): 965-971.
- Eom SY, Zhang YW, Kim SH, Choe KH, Lee KY, Park JD, Hong YC, Kim YD, Kang JW, Kim H. Influence of NQO1, ALDH2, and CYP2E1 genetic polymorphisms, smoking, and alcohol drinking on the risk of lung cancer in Koreans. *Cancer Causes Control* **2009** ; 20(2): 137-145.

- Ferecatu I, Borot MC, Bossard C, Leroux M, Boggetto N, Marano F, Baeza-Squiban A, Andreau K. Polycyclic aromatic hydrocarbon components contribute to the mitochondria-antiapoptotic effect of fine particulate matter on human bronchial epithelial cells via the aryl hydrocarbon receptor. *Particle Fibre Toxicol.* **2010**; 7: 1-14.
- Fernández-Rubio A, López-Cima F, González-Arriaga P, García-Castro L, Pascual T, Marrón MG, Tardón A. The TP53 Arg72Pro polymorphism and lung cancer risk in a population of Northern Spain. *Lung Cancer* **2008**; 61: 309-316.
- Fletcher O. and Houlston R. Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nat Rev Cancer* **2010**; 10: 353-361.
- Gallegos-Arreola M, Gómez B, Morgan V, Arechavaleta M, Arnaud L, Beltrán T, Gaxiola R, Zuñiga G. GSTT1 gene deletion is associated with lung cancer in Mexican patients. *Disease Markers* **2004**; 19: 259-261.
- Gallegos-Arreola M, Figuera-Villanueva L, Troyo-Sanroman R, Morgan-Villela G, Puebla-Pérez AM, Flores Márquez MR and Zúñiga-González GM. CYP1A1*2B and *4 polymorphism are associated with lung cancer susceptibility in Mexican patients. *Int J Biol Markers* **2008**; 23: 1-7.
- Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation. *Lung Cancer* **2006**;55(1): 1-14.
- Gelhaus S, Harvey R, Penning T, Blair IA. Regulation of Benzo[a]pyrene-Mediated DNA- and Glutathione-Adduct Formation by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Human Lung Cells. *Chem Res Toxicol.* **2011**; 24(1): 89-98.
- Gemignani F, Landi S, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L Janout V, et al. Development of lung cancer before the age of 50: the role of xenobiotic metabolizing genes. *Carcinogenesis* **2007**; 28: 1287-1293.
- Giarelli E. and Jacobs LA. Modifying cancer risk factors: the gene-environment interaction. *Semin Oncol Nurs.* **2005**; 21: 271-277.
- González-Arriaga P, López-Cima MF, Fernández-Somoano A, Pascual T, Marrón MG, Puente XS, Tardón A. Polymorphism +17 C/G in matrix metalloprotease MMP8 decreases lung cancer risk. *BMC Cancer* **2008**; 8: 378-383.
- Green A and Battistutta D. Incidence and determinants of skin cancer in a high-risk australian population. *Int J Cancer.* **1990**; 46(3): 356-361.
- Harper P, Wong P, Lam M, Okay A. Polymorphism in the human AH receptor. *Chemicon-Biological Interactions* **2002**; 141: 161-187.
- Harries L, Stubbins M, Forman G, Howard G, and Wolf R. Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase PI locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostata cancer. *Carcinogenesis* **1997**; 18(4): 641-644.

- Hassett C, Aicher L, Sidhu J and Omiecinski C. Human microsomal epoxide hydrolase: Genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* **1994**; 3: 421-428.
- Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene. *J Biochem (Tokyo)* **1991**; 110(3): 407-11.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey JR. Glutathione transferases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* **2005**; 45: 51-88.
- Herrera LA, Benítez-Bribiesca L, Mohar A, Ostrosky-Wegman P. Role of infectious diseases in human carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen.* **2005**; 45(2-3): 284-303.
- Hill C, Wolfe JK, Kinslow CJ, Lopez MS, Abdel-Rahman SZ. The L84F and the I143V in the O⁶-methylguanine –DNA-methyltransferase (MGMT) gene increased human sensitivity to the genotoxic effects of the tobacco-specific nitrosamine carcinogen NNK. *Pharmacogenet Genomics.* **2005**; 15: 571-578.
- Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR. Association of cyclin D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* **2005**; 41(2): 156-60.
- Hosgood III H, Menashe I, Shen M, Yeager M, Yuenger J, Rajaraman P, He X, Chatterjee N, Caporasso N, Zhu Y, et al. Pathway-based evaluation of 380 candidate genes and lung cancer susceptibility suggests the importance of the cell cycle pathway. *Carcinogenesis* **2008**; 29: 1938-1943.
- Houlston R and Peto J. The search low-penetrance susceptibility alleles. *Oncogene* **2004**; 23: 6471-6476.
- Hung R, Boffeta P, Brockmüller J, Haugen A, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper M, Garte S, Hirvonen A, Anttila S, et al. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphism and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis* **2003**; 24: 875-882.
- Hung R, Baragatti M, Thomas D, McKay J, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, et al. Inherited predisposition of lung cancer: A hierarchical modeling approach to DNA repair and cell cycle control pathways. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2007**; 16: 2736-2744.
- Hung R, McKay J, Gaborieau V, Boffeta P, Hashibe M, Zaridze D, Mukeria A, Drabrowska N, Lissowska J, Rudnai P. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature Letters* **2008**; 452: 633-637.
- IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *IARC Sci Pub.* **2002**; 83: 1-12.
- Irarrázabal C, Rojas C, Aracena R, Márquez C and Gil L. Chilean pilot study on the risk of lung cancer associated with codon 72 polymorphism in the gene of protein p53. *Toxicol Lett.* **2003**; 144: 69-76.

- Kawajiri K. Metabolic polymorphism and susceptibility to cancer. Chapter 15 CYP1A1. *IARC Sci Publ* **1999**; 148: 159-172.
- Kelsey K, Park S, Nelson H, Karagas M. A population-based case-control study of the XRCC1 Arg399Gln polymorphism and susceptibility to bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2004**; 13(8): 1337-1341.
- Ketelslegers H, Gottschalk R, Godschalk R, Knaapen AD, Schooten F, Vlietnick F, Kleinjans J and Van Delft J. Interindividual variations in DNA adduct levels assessed by analysis of multiple genetic polymorphism in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**; 15: 624-629.
- ^a Kiyohara C, and Yoshimasu K. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int J Med Sci* **2007**; 4: 59-71.
- ^b Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K and Nakanishi Y. Lung cancer susceptibility: Are we on our way to identifying a high-risk group? *Future Oncol*. **2007**; 3: 617-627.
- Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1:polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* **2006**; 25: 1620-1628.
- Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: Key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry* **2000**; 65: 2-27.
- Koyano S, Saito Y, Fukushima-Uesaka H, Ishida S, Ozawa S, Kamatani N, Minami H, Ohtsu A, Hamaguchi T, Shirao K. Functional analysis of six human aryl hydrocarbon receptor variants in a Japanese population. *Drug Metabolism Disp*. **2005**; 33(8): 1254-1260.
- Lahiri D.K, and Nurnberger J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. **1991**; 19(19): 5444.
- Landi Stefano. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mut Res*. **2000**; 463: 247-283.
- Le Marchand L, Derby, K, Murphy S, Hecht S, Hatsukami D, Carmella S, Tiirikainen M, and Wang H. Smokers with the CHRNA lung cancer-associated variants are exposed to higher levels of nicotine equivalents and a carcinogenic tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Res*. **2008**; 68(22): 9137-9140.
- Lee K, Kang D, Clapper M, Ingelman-Sundberg M, Ono-Kihara M, Kiyohara C, Min S, Lan Q, Le Marchand L, Lin P, et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTT1 polymorphisms, smoking, and lung cancer risk in a pooled analysis among Asian populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2008**; 17: 1120-1126.
- Lévêque C, Marsaud V, Renoir JM, Sola B. Alternative cyclin D1 forms a and b have different biological functions in the cell cycle of B lymphocytes. *Exp Cell Res*. **2007**; 313(12): 2719-2729.
- Lissowska J, Bardin-Mikolajczak A, Fletcher T, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, Fabianova E. Lung cancer and indoor pollution from heating and cooking with solid fuels. *Am J Epidemiol*. **2005**; 162(4): 326-333.

- Liu G, Wheatley-Price P, Zhou W, Park S, Heist RS, Asomaning K, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. Genetic polymorphisms of MDM2, cumulative cigarette smoking and nonsmall cell lung cancer risk. *Int J Cancer* **2008**; 122(4): 915-918.
- Lodovici M, Luceri C, Bacci C, Boddì V, Dolara P. Benzo [a] pireno dioloepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of CYP1A1, GSTM1, GSTP1, and mEH. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2004**; 13(8): 1342-1348.
- Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK and Bell DA. XPD polymorphism: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* **2000**; 21: 551-555.
- Mandal PK. Dioxin: A review of its environmental effects and aryl hydrocarbon receptor biology. *J Comparative Physiol.* **2005**; 175: 221-230.
- Mannervik B, Board P, Hayes J, Listowsky I, and Pearson W. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferase. *Methods Enzimol.* **2005**; 401: 1-8.
- Medina M, y Salazar F. Frecuencia y patrón cambiante del cáncer pulmonar en México. *Salud Pub Mex.* **2000**; 42(4): 333-336.
- Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokinet.* **2002**; 41(5): 329-42.
- Melendez CV, Luch A, Seidel A, and Baird W. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis* **1999**; 20(10): 1885-1891.
- Mendoza-Cantú A, Castorena-Torres F, Bermudez M, Martínez-Hernández R, Ortega A, Salinas JE, Albores A. Genotype and allele frequencies of polymorphic cytochromes P450 CYP1A2 and CYP2E1 in Mexicans. *Cell Biochem Funct.* **2004**; 22: 29-34.
- Meyer MJ, and Bechtold WE. Protein adduct biomarkers: state of the art. *Environ Health Perspect.* **1996**; 104(S5): 879-882.
- Mohr L, Rodgers K. and Silvestri G. Glutathione S-Transferase M1 polymorphism and the risk of lung cancer. *Anticancer Res.* **2003**; 23: 2111-2124.
- Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejía-Loza V, Serrano L, Albores A, Salinas JE, Camacho-Carranza R. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Hum Biol.* **2007**; 79(3): 299-312.
- Morita S, Yano M, Shiozaki H, Tsujinaka T, Ebisui C, Morimoto T, Kishibuti M, Fujita J, Ogawa A and Taniguchi M. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphism are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* **1997**; 71: 192-195.

- Nebert D and McKimmon. Determinantes genéticos de la respuesta tóxica. Capítulo enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. **2006**; 33.21-33.32.
- Neri M, Ugolini D, Dianzani I, Gemignani F, Landi S, Cesario S, Magnani C, Mutti L, Puntoni R, Bonassi S. Genetic susceptibility to malignant pleural mesothelioma and other asbestos-associated diseases. *Mut Res.* **2008**; 659: 126-136.
- Niture S, Velu C, Smith Q, Bhat GJ, Srivenugopal K. Increased expression of the MGMT repair protein mediated by cysteine prodrugs and chemopreventative natural products in human lymphocytes and tumor cell lines. *Carcinogenesis* **2007**; 28(2): 378-389.
- Oakley AJ. Glutathione transferases: new functions. *Curr Opinion Struct Biol.* **2005**; 15: 1-8.
- Ouaissi A, Ouaissi M, and Denis S. Glutathione S-transferase and related proteins from pathogenic human parasites behave as immunomodulatory factors. *Immunol Lett.* **2002**; 81: 159-164.
- Pecorino L. Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, targets and therapeutics. 2th Edition **2008**. Oxford University Press.
- Pemble S, Schroeder R, Spencer S, Meyer D, Hallier E, Bolt H, Ketterer B, and Taylor J. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *J Biochemical* **1994**; 300: 271-276.
- Pérez-Morales R, Castro-Hernández, Gonsebatt M and Rubio J. Polymorphism of CYP1A1*2C, GSTM1*0, and GSTT1*0 in a Mexican mestizo population: A similitude analysis. *Hum Biol.* **2008**; 80: 457-465.
- Pfau W, Martin F, Cole K, Venitt S, Phillips D, Grover P, and Marquardt H. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis* **1999**; 20(4): 545-551.
- Pharoah P, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern R, Easton D and Ponder B. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet.* **2002**; 31: 33-36.
- Proctor R. Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nat Rev Cancer* **2001**; 1: 82-86.
- Qiang M. and Anthony YH. Origins of Individual Variability in P4501A Induction. *Chem Res Toxicol.* **2003**; 16(3): 249-257.
- Quinoñes L, Lucas D, Godoy J, Cáceres D, Berthou F, Varela N, Lee K, Acevedo C, Martínez L, Aguilera A and Gil L. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett.* **2001**; 174: 35-44.
- Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, Moore JH. Multifactor-Dimensionality Reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. *Am J Hum Genet.* **2001**; 69: 139-147.

- Rosenberger A, Illig T, Korb K, Klopp N, Zietemann V, Wölke G, Meese E, Sybrecht G, Kronenberg F, Cebulla M, Degen M. Do genetic factors protect for early onset lung cancer? A case control study before the age of 50 years. *BMC Cancer* **2008**; 8: 60-67.
- Ruddon R. *Cancer Biology*. 4th Edition. **2007**. Oxford University Press
- Ruíz-Godoy L, Rizo P, Sánchez F, Osornio-Vargas A, García-Cuellar C and Meneses A. Mortality due to lung in Mexico. *Lung Cancer* **2007**; 58: 184-190.
- Salamanca-Gómez F. Alteraciones cromosómicas en el cáncer humano. *Salud Púb Méx.* **1995**; 37(2): 162-170.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. (**1987**) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scalan RA. Nitrosamines and cancer. *On line Oregon State University*. **2006**. <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/nitrosamine.html>.
- Schwarz D, Kisselev P, Cascorbi I, Schunck W, and Roots I. Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants. *Carcinogenesis* **2001**; 22(3): 453-459.
- Seidergard J, Vorachek W, Pero R, Pearson W. Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on *trans*-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci.* **1988**; 85: 7293-7297.
- Seker H, Butkiewics D, Bowman E, Rusin M, Hedayati M, Grossman L, Harris C. Functional significance of XPD polymorphic variants: Attenuated apoptosis in human lymphoblastoid cells with the XPD 312 Asp/Asp genotype. *Cancer Res.* **2001**; 61: 7430-7434.
- Selvin S. *Statistical analysis of epidemiological data*. Oxford University Press (**1996**). 467 pág.
- ^a Shah PP, Singh AP, Singh M, Mathur N, Mishra N, Pant MC, Parmar D. Association of functionally important polymorphisms in cytochrome P4501B1 with lung cancer. *Mut Res / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2008**; 643(1-2): 4-10.
- ^b Shah PP, Singh A, Singh M, Mathur N, Pant M, Mishra B and Parmar D. Interaction of cytochrome P4501A1 genotypes with other risk factors and susceptibility to lung cancer. *Mutat Res.* **2008**; 639: 1-10.
- Shaw GL, Falk RT, Frame JN, Weiffenbach B, Nesbitt JC, Pass HI, Caporaso NE, Moir DT, Tucker MA. Genetic polymorphism of CYP2D6 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1998**; 7: 215-219.
- Smith C. and Harrison D. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* **1997**; 350: 630-633.

- Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer G. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst.* **2000**; 92(10): 803-811.
- Sobti R, Kaur P, Kaur S, Janmeja A, Jindal S, Kishan J and Raimondi S. Combined effect of GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism on histological subtypes of lung cancer. *Biomarkers* **2008**; 13: 282-295.
- Sofer-Levi Y and Resnitzky D. Apoptosis induced by ectopic expression of cyclin D1 but not cyclin E. *Oncogene* **1996**; 13(11): 2431-2437.
- Sosa-Macías M, Elizondo G, Flores-Pérez C, Flores-Pérez J, Bradley-Alvarez F, Alanis-Bañuelos RE, Lares-Asseff I. CYP2D6 genotype and phenotype in Amerindians of Tepehuano origin and Mestizos of Durango, Mexico. *J Clin Pharmacol.* **2006**; 46(5): 527-536.
- Spitz MR, Wu X, Wang Y, Wang L, Shete S, Amos C, Guo Z, Lei L, Mohrenweiser H, and Wei Q. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphism in lung cancer patients. *Cancer Res.* **2001**; 61: 1354-1357.
- Sreeja L, Syamala V, Hariharan S, Syamala VS, Raveendran PB, Sivanandan CD, Madhavan J, Ankathil R. Glutathione S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms: susceptibility and outcome in lung cancer patients. *J Exp Ther Oncol.* **2008**; 7(1): 73-85.
- Stellman SD, Muscat JE, Thompson S, Hoffmann D, Wynder E. Risk of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung in relation to lifetime filter cigarette smoking. *Cancer* **1997**; 80(3): 383-388.
- Suh Y, and Vijg J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mut Res.* **2005**; 573: 41-53.
- Taioli E, Ford J, Trachman J, Li Y, Demopoulos R and Garte S. Lung cancer risk and CYP1A1 genotype in African Americans. *Carcinogenesis* **1998**; 19: 813-817.
- Taioli E, Gaspari L, Benhamou S, Boffetta P, Brockmoller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, Dolzan V, Haugen A, Hirvonen A. Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years. *Int J Epidemiol.* **2003**; 32(1): 60-3.
- Taioli E, Pedotti P, Garte S. Importance of allele frequency estimates in epidemiological studies. *Mut Res.* **2004**; 567: 63-70.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewsky G. Two polymorphic variants of wild type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cellular Biol.* **1999**; 1092-1100.
- Thorgeirsson T, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnosson K, Manolescu A, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nat Letters.* **2008**; 452: 638-642.

- Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett.* **2005**; 227(2): 115-24.
- Uchimoto T, Itoga S, Nezu M, Sunaga M, Tomonaga T, Nomura F. Role of the genetic polymorphisms in the 5'-flanking region for transcriptional regulation of the human CYP2E1 gene. *Alcoholism: Clin Exp Res.* **2007**; 31(S1): 36S-42S.
- Ueshima Y, Tsutsumi M, Takase S, Matsuda Y, Kawahara H. Acetaminophen metabolism in patients with different cytochrome P-450E1 genotypes. *Alcoholism: Clin Exp Res.* **1996**; 20 (S1): 25a-28a.
- Ulybina YM, Kuligina ESh, Mitiushkina NV, Rozanov ME, Ivantsov AO, Ponomariova DN, Togo AV, Levchenko EV, Shutkin VA, Brenister SI, Devilee P, Zhivotovsky B, Hirvonen A, Imyanitov EN. Coding polymorphisms in Casp5, Casp8 and DR4 genes may play a role in predisposition to lung cancer. *Cancer Lett.* **2009**; 278(2): 183-91.
- Valdés-Salgado R, y Ayala-Rosenblueth I. Boletín para el control del tabaco. *Inst Nal Salud Pub* **2004**; 4: 1-8.
- Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, and Boffetta P. Metabolic polymorphism and susceptibility to cancer. Chapter 7. *IARC Sci Publ* **1999**; 148: 102-117.
- Vineis P, Manuguerra M, Kavvoura F, Guarrera S, Allione A, Rosa F, Di Gregorio A, Polidoro S, Saletta F, Ioannidis J and Matullo G. A field synopsis on low-penetrance variants in DNA repair genes and cancer susceptibility. *J Natl Cancer Inst.* **2009**; 101: 24-36.
- Vogel U, Christensen J, Wallin H, Friis S, Nexø BA, Raaschou-Nielsen O, Overvad K, Tjønneland A. Polymorphisms in genes involved in the inflammatory response and interaction with NSAID use or smoking in relation to lung cancer risk in a prospective study. *Mutat Res.* **2008**; 639(1-2): 89-100.
- Voho A, Metsola K, Anttila S, Impivaara O, Järvisalo J, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K and Hirvonen A. EPHX1 gene polymorphism and individual susceptibility to lung cancer. *Cancer Lett.* **2006**; 237: 102-108.
- Wacholder S, Chanock S, García-Closas M, El ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: An approach for molecular epidemiology studies. *J Nat Cancer Inst.* **2004**; 96(6): 434-442.
- Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **2009**; 9: 489-499.
- Wang H, Jin G, Wang H, Liu G, Qian J, Jin L, Wei Q, Shen H, Huang W, Lu D. Genetic susceptibility of lung cancer associated with common variants in the 3' untranslated regions of the adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and ABCC1 candidate transporter genes for carcinogen export. *Cancer* **2009**; 115(3): 595-607.

- Wang L, Habuchi T, Takahashi T, Mitsumori K, Kamamoto T, Kakei Y, Kakinuma H, Sato K, Nakamura A, Ogawa O and Kato T. Cyclin D1 gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer. *Carcinogenesis* **2002**; 23: 257-264.
- Wang S, B.S, Samet J, M.D, M.S. Tobacco smoking and cancer: The promise of molecular epidemiology. *Salud Pú b Méx.* **1997**; 39(4): 331-345.
- Wang W, Spitz M, Yang H, Lu C, Stewart D, Wu X. Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to lung cancer. *Clin Cancer Res.* **2007**; 13(19): 5974-5981.
- Wang Y, Yang H, Li H, Li Li, Wang H, Liu C, Zheng Y. Association between X-ray repair cross complementing group 1 codon 399 and 194 polymorphisms and lung cancer risk: A meta-analysis. *Cancer Letters* **2009**; 285: 134-140.
- Watanabe J, Hayashi S, and Kawajiri K. Different Regulation and Expression of the Human CYP2E1 Gene Due to the RsaI Polymorphism in the 5'-Flanking Region. *J Biochem.* **1994**; 116(2): 321-326.
- Whibley C, Pharoah PD, Hollstein M. p53 polymorphism: cancer implications. *Nat Rev Cancer.* **2009**; 9: 95-107.
- Wynder E. y Muscat J. The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environ Health Persp.* **1995**; 103(S8): 143-148.
- Xie Y and Minna J. Predicting the future for people with lung cancer. *Nat Med.* **2008**; 14: 812-813.
- Yang M, Choi Y, Hwangbo B, Soo Lee J. Combined effects of genetics polymorphism in six selected genes on lung cancer susceptibility. *Lung Cancer* **2007**; 57: 135-142.
- Yang XR, Wacholder S, Xu Z, Dean M, Clark V, Gold B, Brown LM, Fraumeni JR, Caporaso NE. CYP1A1 and GSTM1 polymorphism in relation to lung cancer risk in Chinese women. *Cancer Lett.* **2004**; 214(2): 197-204.
- Yang L, Wang I, Shi G, Ni L, Song C, Zhang Z, Xu SF. Analysis of HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 alleles in Chinese patients with lung cancer. *Genet Mol Res.* **2010**; 9(2): 750-755.
- Yoon K, Kim J, Gil H, Hwang H, Hwangbo B and Lee J. CYP1B1, CYP1A1, MPO, and GSTP1 polymorphism and lung cancer in never-smoking Korean women. *Lung Cancer* **2008**; 60: 40-46.
- Yu H, Lin K, Ota D, Lynch H. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: preventive management. *Cancer Treatment Reviews.* **2003**; 29(6): 461-470.
- Zhan P, Wang J, Zhang Y, Qiu L, Zhao S, Qian Q, Wei S, Yu L and Song Y. CYP2E1 Rsa I/PstI polymorphism is associated with lung cancer risk among Asians. *Lung Cancer* **2010**; 69: 19-25.
- Zheng H, Wang Z, Shi X, Wang Z. XRCC1 polymorphism and lung cancer risk in Chinese populations: A meta-analysis. *Lung Cancer* **2009**; 65: 268-273.

- Zhong Y, Huang Y, Huang Y, Zhang T, Ma C, Zhang S, Fan W, Chen H, Qian J, Lu D. Effects of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) polymorphism on cancer: a meta-analysis. *Mutagenesis* **2010**; 25(1): 83-95.
- Zhou W, Liu G, Thurston S, Xu L, Miller D, Wain J, Lynch T, Su L and Christiani DC. Genetic polymorphism in N-acetyltransferase-2 and microsomal epoxide hydrolase, cumulative cigarette smoking, and lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* **2002**; 11: 15-21.
- Zhou W, Liu G, Miller D, Thurston S, Xu L, Wain J, Lynch T, Su L, Christiani D. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* **2003**; 12: 359-365.
- Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland, Phillips D, Canzian F and Haugen A. Polymorphism of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* **2006**; 27: 560-567.
- Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal S, Srivastava S, Awasthi S, Awasthi C. Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem.* **1994**; 224: 893-899.
- Zimniak L, Awasthi S, Srivastava SK, Zimniak P. Increased resistance to oxidative stress in transfected cultured cells overexpressing glutathione S-transferase mGSTA4-4. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1997**; 143(1): 221-9.

Fuentes de Internet

GenePop statistical package, <http://genepop.curtin.edu.au> (October 5, 2010)

www.iarc.fr (Reporte IARC 2002 y 2008)

www.who.int/whr/2000/es/index.html (Reporte OMS, 2000)

www.genatlas.org

<http://globocan.iarc.fr/>



Polymorphisms associated with the risk of lung cancer in a healthy Mexican Mestizo population: Application of the additive model for cancer

Rebeca Pérez-Morales^{1,*}, Ignacio Méndez-Ramírez², Clementina Castro-Hernández¹, Ollin C. Martínez-Ramírez¹, María Eugenia Gonsebatt¹ and Julieta Rubio¹

¹*Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México.*

²*Departamento de Probabilidad y Estadística, Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México.*

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in Mexico and worldwide. In the past decade, there has been an increase in the number of lung cancer cases in young people, which suggests an important role for genetic background in the etiology of this disease. In this study, we genetically characterized 16 polymorphisms in 12 low penetrance genes (*AhR*, *CYP1A1*, *CYP2E1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *XRCC1*, *ERCC2*, *MGMT*, *CCND1* and *TP53*) in 382 healthy Mexican Mestizos as the first step in elucidating the genetic structure of this population and identifying high risk individuals. All of the genotypes analyzed were in Hardy-Weinberg equilibrium, but different degrees of linkage were observed for polymorphisms in the *CYP1A1* and *EPHX1* genes. The genetic variability of this population was distributed in six clusters that were defined based on their genetic characteristics. The use of a polygenic model to assess the additive effect of low penetrance risk alleles identified combinations of risk genotypes that could be useful in predicting a predisposition to lung cancer. Estimation of the level of genetic susceptibility showed that the individual calculated risk value (iCRV) ranged from 1 to 16, with a higher iCRV indicating a greater genetic susceptibility to lung cancer.

Key words: additive model, genetic polymorphism, lung cancer, Mexicans, molecular epidemiology.

Received: February 3, 2011; Accepted: July 18, 2011.

Introduction

Lung cancer (LC) is the major cause of mortality from neoplasias worldwide. In Mexico, LC was responsible for 11.45% of deaths by malignant neoplasia from 1998-2002, and a prospective study indicated that mortality from LC will be even greater in the future (Ruíz-Godoy *et al.*, 2007). Lung cancer is a serious public health problem (Proctor, 2001). The World Health Organization (WHO) estimates that in 2030 the number of deaths attributable to the consumption of tobacco will be 100 million, accompanied by an increased incidence of LC (Xie and Minna, 2008).

Lung cancer is highly related to tobacco consumption, although only 20% of smokers develop LC. On other hand, the number of cases among people under 50 years old

has increased (Gemignani *et al.*, 2007), highlighting the importance of genetic background in the etiology of LC. In this context, efforts have been made to identify polymorphisms associated with the risk of developing LC. Association studies have focused mainly on polymorphisms in genes coding for (1) enzymes involved in the bioactivation of carcinogens, such as cytochromes P450 *CYP1A1* (Shah *et al.*, 2008), *CYP2E1* (Zhan *et al.*, 2010) and *CYP2D6* (Shaw *et al.*, 1998), (2) enzymes involved in detoxification, *e.g.*, glutathione transferases *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* (Sobti *et al.*, 2008), N-acetyl transferase 2 (*NAT2*) and epoxide hydrolase (*EPHX1*) (Zhou *et al.*, 2002), (3) proteins involved in DNA repair, such as *XRCC1*, *XRCC3*, *ERCC2*, *ERCC4*, *MGMT* and *OGG1* (Zienolddiny *et al.*, 2006; Hung *et al.*, 2007) and (4) proteins implicated in the cell cycle and apoptosis, such as *CCND1*, *CHEK2*, *MDM2*, *TP53* and *EGF* (Hosgood III *et al.*, 2008).

In some populations, a significant association between gene polymorphisms and the risk of LC risk has been established, while in other populations no associations have been found, probably because of the low frequency of polymorphisms. For example, the *CYP1A1* rs1048943

Send correspondence to Julieta Rubio. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 Mexico City, México. E-mail: juruli@unam.mx.
*Present address: Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Artículo 123 s/n, Col. Filadelfia 35010 Gómez Palacio, Durango, México.

(Ile462Val) polymorphism is associated with a risk of LC in Asian Korean, Chinese and Japanese populations (Lee *et al.*, 2008) and in Chilean (Quinoñes *et al.*, 2001), Mexican (Gallegos-Arreola *et al.*, 2008) and Afro-American (Taioli *et al.*, 1998) populations, whereas this association has not been confirmed in American and European Caucasians, possibly because the frequency of the *CYP1A1* rs1048943 polymorphism in these populations is < 2% (Hung *et al.*, 2003). In contrast, the *GSTM1* deletion polymorphism, which has a frequency of 0.35–0.58 in Asians, European and American Caucasians and Africans (Mohr *et al.*, 2003), is significantly associated with LC in Caucasians (Hung *et al.*, 2003) and Asians (Lee *et al.*, 2008). *ERCC2* rs1799793 (Asp399Asn), *ERCC2* rs13181 (Lys751Asn) and *MGMT* rs12917 (Leu84Phe) polymorphisms show no consistent association with LC in different populations (Kiyohara and Yoshimasu, 2007). However, *XRCC1* rs3213245 (-77 T > C) was associated with a risk of LC in three case-control studies and *ERCC2* rs13181 was associated with a risk of LC in a meta-analysis study of 18 case-control reports (Vineis *et al.*, 2009).

Since these polymorphisms modify the functionality of the encoded proteins it has been suggested that polymorphic variants may alter the metabolic and detoxification pathways of carcinogenic compounds, thereby predisposing the individual bearing these polymorphisms to develop cancer (Nebert and Dalton, 2006). Indeed, polymorphisms in specific genes can modulate the formation of DNA-carcinogen adducts (Ketelslegers *et al.*, 2006) which favors the generation of mutations leading to LC, particularly in smokers (Lodovici *et al.*, 2004).

Recently, a polygenic cancer model was proposed that considers the genetic susceptibility to cancer as a global mechanism, with the susceptibility being defined by low risk alleles in multiple candidate genes (Pharoah *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2008). Susceptibility to LC may be caused by low penetrance genes (low risk) with high frequencies in the general population (Kiyohara *et al.*, 2007). In this context, susceptibility to LC is determined by a combination of multiple low risk alleles in an individual, with each allele contributing only slightly to the overall cancer risk, as proposed by Fletcher and Houlston (2010) in their polygenic additive model. This model, which allows the identification of high risk individuals, may be useful in preventing LC in the early stages, thereby significantly reducing LC-related mortality and the costs associated with the diagnosis and treatment of this disease.

The first step in any study of molecular epidemiology in which ethnicity plays an important role is the characterization of the general healthy population since this will provide the benchmark for further analysis. In this study, we investigated 16 polymorphisms in 12 low penetrance genes in a healthy Mexican Mestizo population. These genes code for proteins involved in the metabolic pathways of some environmental and tobacco smoke carcinogens, with their

polymorphisms reportedly producing functional alterations that are associated with the risk of developing LC. The association between these polymorphisms and the risk of cancer was assessed using the polygenic additive model for cancer.

Materials and Methods

Subjects

The research protocol was approved by the Committee of Bioethics of the Instituto de Investigaciones Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México, and the Hospital “20 de Noviembre” ISSSTE gave permission to use the buffy coat of blood bank samples as a source of DNA. The study included 382 unrelated, healthy Mexican Mestizo individuals whose parents and grandparents were born in Mexico. After providing informed consent, the subjects answered a questionnaire that included information on their age, gender, smoking status and lifestyle.

Polymorphism analysis

Genomic DNA was obtained from blood samples by phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation (Sambrook *et al.*, 1987). The presence of the *AhR* rs2066853 (Arg554Lys) polymorphism was determined by using the TaqMan probe C_11170747_20 from Applied Biosystems, according to the manufacturer’s recommendations. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was used to assess the following polymorphisms: *CYP1A1* rs4646903 (6235T > C) and *CYP1A1* rs1800031 (5639T > C) (Kawajiri, 1999), *CYP1A1* rs1048943 (Ile462Val) and *CYP1A1* rs1799814 (Thr461Asn) (Cascorbi *et al.*, 1996), *CYP2E1* rs2031920 (-1053C > T) (Morita *et al.*, 1997), *EPHX1* rs1051740 (Tyr113His) and *EPHX1* rs2234922 (His139Arg) (Smith and Harrison, 1997), *GSTP1* rs947894 (Ile105Val) (Harries *et al.*, 1997), *XRCC1* rs25487 (Arg399Gln) (Abdel-Rahman and El-Zein, 2000), *ERCC2* rs13181 (Lys751Gln) (Lunn *et al.*, 2000), *MGMT* rs12917 (Leu84Phe) (Courtney *et al.*, 2005), *CCND1* rs603965 (870G > A) (Wang *et al.*, 2002), and *TP53* rs1042522 (Arg72Pro) (Irrarázabal *et al.*, 2003). Polymorphisms of *GSTT1* null and *GSTM1* null were determined by multiplex PCR using a previously reported protocol (Abdel-Rahman *et al.*, 1996).

Statistical analyses

The statistical package GenePop version 4.0.10 (<http://genepop.curtin.edu.au>) was used to assess whether the genotypes of each gene were in Hardy-Weinberg equilibrium and to determine the degree of linkage between the *EPHX1* and *CYP1A1* gene polymorphisms. Conglomerate and hierarchical clustering analyses were used to determine the genetic variability of the sample. The estimated cancer risk and the genotypic and allelic frequencies were determined using the statistical package JMP version 8.

Results

Of the 382 Mexican Mestizo individuals studied, 29% were women and 71% were men. The age range was between 18 and 80 years (mean age: 39.2 ± 12.1 for men and 41.5 ± 13.1 for women) and 48% of the population were smokers.

The following polymorphisms were studied in candidate genes: *Ahr* rs2066853, *CYP1A1* rs4646903, *CYP1A1* rs1048943, *CYP1A1* rs1800031, *CYP1A1* rs1799814, *CYP2E1* rs2031920, *EPHX1* rs1051740, *EPHX1* rs2234922, *GSTM1* null, *GSTT1* null, *GSTP1* rs947894, *XRCC1* rs25487, *ERCC2* rs13181, *MGMT* rs12917, *CCND1* rs603965 and *TP53* rs1042522. The genotypic and allelic frequencies of these polymorphisms are shown in Table 1. All genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. *GSTM1* and *GSTT1* were not analyzed for Hardy-Weinberg equilibrium because the methodology did not allow discrimination between heterozygous and homozygous positive genotypes.

Polymorphisms in the same gene may have synergistic or antagonistic effects, as in the case of *CYP1A1* and epoxide hydrolase 1. This is functionally significant because *CYP1A1* acts in association with *EPHX1* to convert polyaromatic hydrocarbons to highly toxic, mutagenic and carcinogenic epoxides.

Linkage analysis of four *CYP1A1* and two *EPHX1* polymorphisms showed that the *CYP1A1* rs1799814 and *CYP1A1* rs1800031 genotypes were linked in all cases,

with a probability of 1 ($p < 0.001$), whereas *CYP1A1* rs4646903 and *CYP1A1* rs1048943 polymorphisms were not linked, with a probability of 0 ($p < 0.001$). *EPHX1* rs1051740 and *EPHX1* rs2234922 were linked, with a probability of 0.03254 ($p = 0.0025$). Combinations of *CYP1A1* polymorphisms are shown in Table 2.

Conglomerate analysis was used to determine the genetic variability and the possible grouping of the individuals analyzed. We identified six groups that clustered according to their genetic characteristics, although there was considerable heterogeneity (Figure 1). Additionally, hierarchical cluster analysis of the genotypes showed that *CYP1A1* rs1800031 and *CYP1A1* rs1799814 polymorphisms clustered together, whereas *CYP1A1* rs4646903 and *CYP1A1* rs1048943 were close to each other but clustered separately (Figure 2). The *EPHX1* rs1051740 and *EPHX1* rs2234922 polymorphisms were widely separated, as also indicated by linkage analysis.

To determine the theoretical levels of susceptibility to LC, a risk matrix was generated using a log-additive model in which a value of 0 was assigned to homozygous genotypes that produced no risk, 1 to heterozygous genotypes (medium risk) and 2 to homozygous genotypes that produced changes in the activity of the protein, considered to be high risk. The individual calculated risk values (iCRVs) were determined by adding the values of the log-additive model to each locus. The iCRVs ranged from 1 to 16, although there was a marked decrease in individuals with $iCRV \leq 5$ and ≥ 12 (Figure 3).

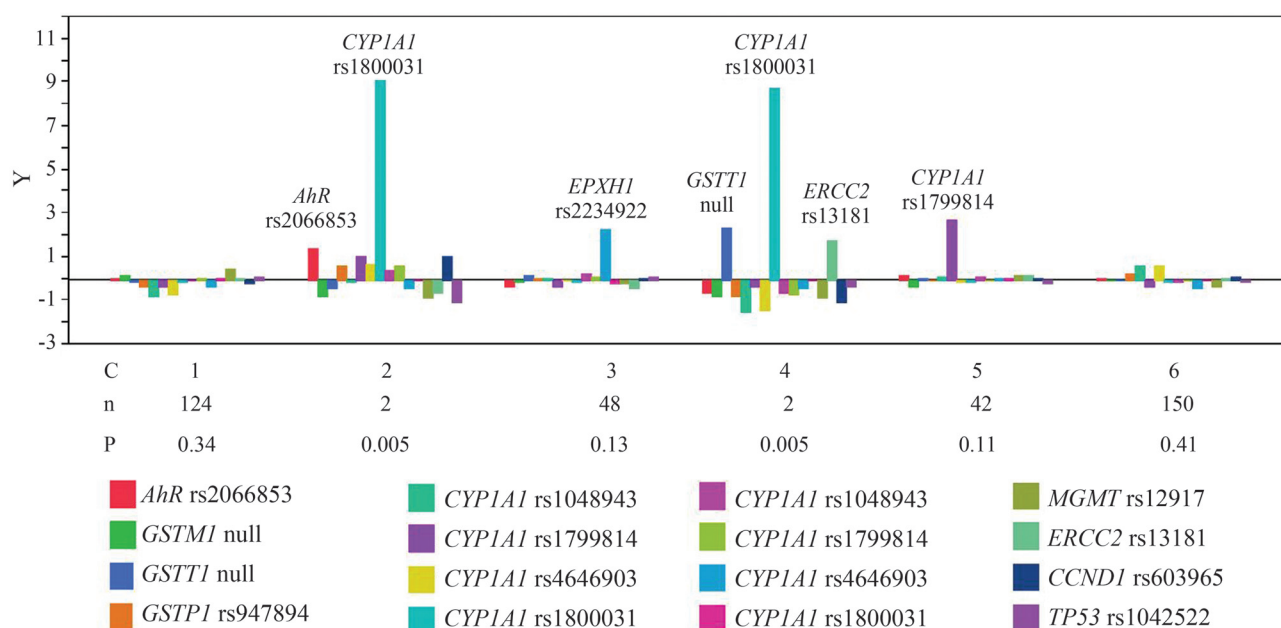
Table 1 - Frequency of lung cancer risk polymorphisms among healthy Mexican Mestizos.

Gene (rs)	Genotype frequency, n (%)						Allelic frequency	
	Mutant allele	n	Wild type homozygous	Heterozygous	Mutant homozygous	p ^b	q ^c	
<i>Ahr</i> (2066853)	Lys	370	260 (70.2)	107 (29)	3 (0.8)	0.85	0.15	
<i>CYP1A1</i> (4646903)	C	382	97 (25.4)	193 (50.5)	92 (24.1)	0.51	0.49	
<i>CYP1A1</i> (1048943)	Val	382	86 (22.5)	176 (46.1)	120 (31.4)	0.45	0.55	
<i>CYP1A1</i> (1800031)	C	382	378 (99)	4 (1)	0	0.994	0.006	
<i>CYP1A1</i> (1799814)	Asn	382	339 (88.7)	39 (10.3)	4 (1)	0.946	0.054	
<i>CYP2E1</i> (2031920)	T	382	272 (71.2)	102 (26.7)	8 (2.1)	0.85	0.15	
<i>EPHX1</i> (1051740)	His	382	121 (31.7)	133 (34.8)	128 (33.5)	0.49	0.51	
<i>EPHX1</i> (2234922)	Arg	382	323 (84.6)	55 (14.4)	4 (1)	0.92	0.08	
<i>GSTP1</i> (947894)	Val	382	102 (26.7)	192 (50.3)	88 (23)	0.52	0.48	
<i>GSTM1</i> (deletion)	Null	382	239 (62.6)	ND ^a	143 (37.4)	0.63	0.37	
<i>GSTT1</i> (deletion)	Null	382	324 (84.8)	ND ^a	58 (15.2)	0.85	0.15	
<i>XRCC1</i> (25487)	Gln	382	211 (55.2)	147 (38.5)	24 (6.3)	0.75	0.25	
<i>ERCC2</i> (13181)	Gln	382	258 (67.5)	98 (25.7)	26 (6.8)	0.8	0.2	
<i>MGMT</i> (12917)	Phe	382	205 (53.7)	125 (32.7)	52 (13.6)	0.7	0.3	
<i>CCND1</i> (603965)	A	382	162 (42.4)	156 (40.8)	64 (16.8)	0.63	0.37	
<i>TP53</i> (1042522)	Pro	382	163 (42.7)	159 (41.6)	60 (15.7)	0.64	0.36	

^aNot determined. ^bp – wild type allele. ^cq – mutant allele.

Table 2 - Linkage analysis of the *CYP1A1* and *EPHX1* loci.

Gene	Locus 1 genotype	Locus 2 genotype	Linkage probability	p	Switches
<i>CYP1A1</i>	rs1048943 Val/Val	rs4646903 C/C	0	< 0.001	86515
	rs1048943 Val/Val	rs1800031 C/C	0.269010	0.003075	53643
	rs1048943 Val/Val	rs1799814 Asn/Asn	0.236880	0.006550	62708
	rs1800031 C/C	rs4646903 C/C	0.811290	0.001748	53666
	rs1799814 Asn/Asn	rs4646903 C/C	0.196950	0.005966	62546
	rs1799814 Asn/Asn	rs1800031 C/C	1	< 0.001	14571
<i>EPHX1</i>	rs1051740 His/His	rs2234922 Arg/Arg	0.03254	0.002541	64999

**Figure 1** - Conglomerate analysis showing the genetic heterogeneity of the population studied in this work. C – cluster number, n – number of individuals per cluster and P – the probability of each cluster. Only under-represented genotypes are shown.

Discussion

Cancer is a polygenic disease, the risk of which may be related to the presence of low-penetrance genes that have additive effects. In this study, we examined the frequency of some polymorphisms possibly related to the risk of developing lung cancer in a sample of healthy Mexican Mestizos. These polymorphisms may be useful biomarkers of genetic susceptibility to lung cancer in specific populations.

We have previously reported on the high frequency of the *CYP1A1* rs1048943 polymorphism in Mexican Mestizos (Pérez-Morales *et al.*, 2008), a polymorphism that is highly represented in Amerindians (Kvitko *et al.*, 2000). In

some populations, the *CYP1A1* rs1048943 polymorphism has been associated with a risk of LC (Quinoñes *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008), although not all studies have found such an association, especially when the frequency of this polymorphism is very low, as in European and American Caucasian populations (Hung *et al.*, 2003). However, in some populations the *CYP1A1* rs1048943 polymorphism has a significant influence on the risk of developing LC because of the additive effect of other polymorphisms.

Although the *CYP1A1* rs1799814 and *CYP1A1* rs1800031 genotypes were found to be linked, the linkage analysis may have been affected by the high frequencies of

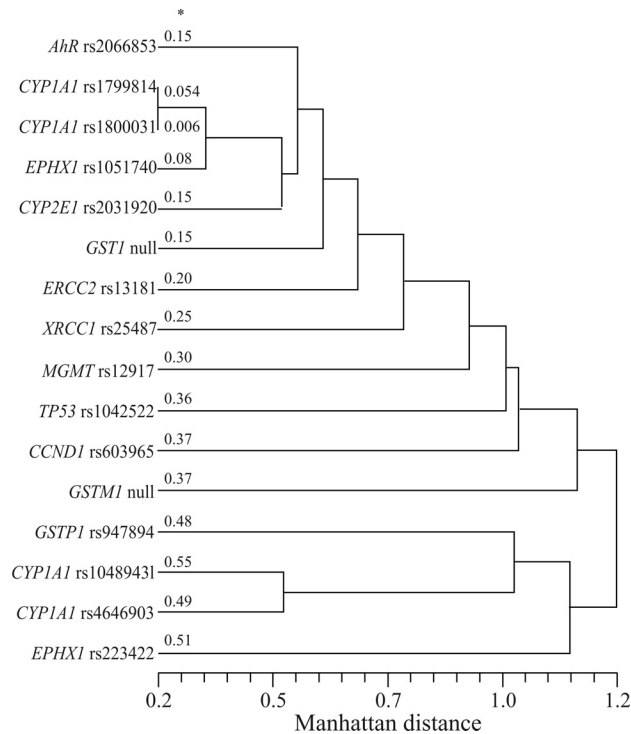


Figure 2 - Hierarchical cluster analysis of the different genotypes based on the genetic characteristics of healthy Mexican Mestizos. $r = 0.94939$. *Allelic frequencies of the polymorphic genotypes.

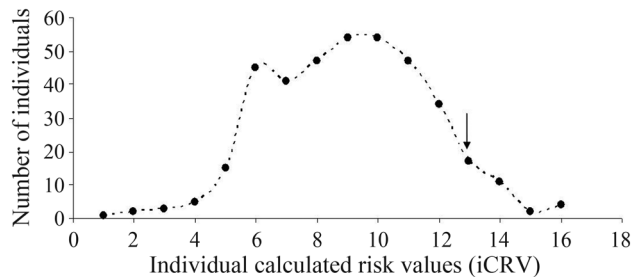


Figure 3 - Estimated risk of lung cancer in a healthy Mexican Mestizo population. The arrow indicates the 85th percentile.

the wild type allele at these loci in our population. On the other hand, in contrast to a previous report (Hayashi *et al.*, 1991), the *CYP1A1* rs4646903 and *CYP1A1* rs1048943 polymorphisms were not linked. This observation is functionally significant because the *CYP1A1* rs1048943 polymorphism increases the activity of cytochrome CYP1A1, resulting in a more efficient generation of reactive metabolites, whereas the *CYP1A1* rs4646903 polymorphism increases the levels of CYP1A1 mRNA. Hence, the combination of these alleles could increase the risk of LC (Yoon *et al.*, 2008). Some studies have associated *CYP1A1* rs1799814 polymorphism with a risk of LC (Gallegos-Arreola *et al.*, 2008), whereas *CYP1A1* rs1800031 is reportedly specific for African populations but is not associated with a risk of LC (Taioli *et al.*, 1998).

The proportion of the population carrying both the *EPHX1* rs1051740 and *EPHX1* rs2234922 alleles was very small. In these individuals, the allele *EPHX1* rs1051740 Tyr113 apparently offered no protection against LC, in contrast to previous observations (Voho *et al.*, 2006). On the other hand, the *EPHX1* rs2234922 139Arg variant increases the activity of the encoded enzyme (Hassett *et al.*, 1994), which could suppress the low activity of the *EPHX1* 113His variant (Salam *et al.*, 2007). For example, an individual with the *CYP1A1* rs4646903, *CYP1A1* rs1048943, *EPHX1* rs1051740 and *EPHX1* rs2234922 polymorphisms will produce reactive metabolites more efficiently and consequently have a higher risk of developing LC.

A conglomerate analysis of the genetic variability of the population studied here revealed six groups that clustered according to their genetic characteristics (Figure 1). In clusters 2 and 4, the polymorphism *CYP1A1* rs1800031 was quite separate from the rest of the genotypes, although it should be noted that these two groups consisted of only two subjects each such that the probability of finding individuals belonging to these clusters in a given population is very low. In clusters 2, 3, 4 and 5, *AhR* rs2066853, *EPHX1* rs2234922, *GSTM1* null, *ERCC2* rs13181, and *CYP1A1* rs1799814 were over-represented with respect to the other polymorphisms analyzed, but the number of individuals was smaller than in clusters 1 and 6; there was no predominant genotype in the latter two clusters because of the combination of polymorphic alleles at each locus in each individual. Despite this clustering, our findings indicate that the population studied was highly heterogeneous, as is characteristic of Mexican Mestizos.

Hierarchical cluster analysis showed that the genes were grouped according to their frequency. This analysis also revealed that *CYP1A1* rs1800031 and *CYP1A1* rs1799814 occurred together, in agreement with the linkage analysis, whereas *CYP1A1* rs4646903 and *CYP1A1* rs1048943 were found together in some individuals but were not linked (as indicated by the separation of their branches). Overall, this analysis showed that a portion of the population carried both risk alleles, although they were not linked. However, we have not determined whether these polymorphisms are in a *cis* or *trans* position, which could affect the linkage results.

Our analysis revealed individuals with a high susceptibility to LC based on the presence of risk genotypes, although different combinations of risk genotypes may confer varying degrees of susceptibility when combined with other components, such as environmental factors.

If the risk of developing LC is attributed to the interaction of several low-penetrance genes that exert an additive effect then we should be able to detect individuals with a high number of risk alleles and a greater genetic susceptibility to LC. We estimated the levels of susceptibility and found that the iCRV ranged from 1 to 16; there was a marked decrease in the susceptibility to LC among individ-

uals with an $iCRV \geq 12$. Application of the polygenic model (Fletcher and Houlston, 2010) (Figure 3) yielded a normal distribution of risk alleles in which low and high risk individuals occurred at the extremes of the distribution. Theoretically, high-risk individuals should be more susceptible to LC, but one cannot exclude the important role of genotype x environmental interactions to which individuals are exposed.

Based on the polygenic model of cancer, which takes into consideration the additive effect of multiple risk alleles, the high risk genotypes identified in this study included genes involved in phase I and II metabolism, DNA repair, oxidative stress and cell cycle regulation. All of these gene groups need to be considered when analyzing the efficiency of reactive metabolite generation, DNA-adduct repair, damage persistence and the cellular response to cycle arrest or apoptosis. However, as shown here, only a small minority of individuals actually possess a large number of risk alleles. Although studies of other populations have associated specific polymorphisms with a risk of LC, these relationships have not always been confirmed, possibly because of the pleiotropic or epistatic effects of one genotype on another within the same population.

Since LC is a multifactorial, polygenic disease, it is incorrect to attribute the susceptibility to LC to a single gene or group of related genes. In this context, determining the genetic background of a healthy population, such as done here for a Mexican Mestizo population, can provide a sound basis for subsequent studies on the association between these risk genotypes and LC. In such cases, the $iCRV$ should be higher in patients than in the healthy controls.

Acknowledgments

This study was supported by a grant (PAPIIT-1N219807) from the Universidad Nacional Autónoma de México to J.R. and a post-graduate scholarship (no. 204279) from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología to R.P. We thank Dr. Sergio García Méndez, head of the Blood Bank, Hospital “20 de Noviembre” ISSSTE in Mexico City, for providing the samples, and Dr. Pavel Petrosyan for critical reading of the manuscript.

References

- Abdel-Rahman S and El-Zein R (2000) The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene *XRCC1* modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett* 159:63-71.
- Abdel-Rahman S, El-Zein R, Anwar W and Au W (1996) A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of *GSTM1* and *GSTT1* genes in population studies. *Cancer Lett* 107:229-233.
- Cascorbi I, Brockmüller J and Roots I (1996) A C4887A polymorphism in exon 7 of human *CYP1A1*: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 56:4965-4969.
- Courtney E, Wickliffe J, Wolfe K, Kinslow C, Lopez M and Abdel-Rahman S (2005) The L84F and the I143V polymorphism in the O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (*MGMT*) gene increase human sensitivity to the genotoxic effects of the tobacco-specific nitrosamine carcinogen NNK. *Pharmacogenet Genomics* 15:571-578.
- Dong L, Potter J, White E, Ulrich C, Cardon L and Peters U (2008) Genetic susceptibility to cancer: The role of polymorphism in candidate genes. *JAMA* 299:2423-2434.
- Fletcher O and Houlston R (2010) Architecture of inherited susceptibility to common cancer. *Nat Rev Cancer* 10:353-361.
- Gallegos-Arreola M, Figuera-Villanueva L, Troyo-Sanroman R, Morgan-Villela G, Puebla-Pérez AM, Flores Márquez MR and Zúñiga-González GM (2008) *CYP1A1**2B and *4 polymorphism are associated with lung cancer susceptibility in Mexican patients. *Int J Biol Markers* 23:1-7.
- Gemignani F, Landi S, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Foretova L, Janout V, *et al.* (2007) Development of lung cancer before the age of 50: The role of xenobiotic metabolizing genes. *Carcinogenesis* 28:1287-1293.
- Harries L, Stubbins M, Forman D, Howard G and Wolf R (1997) Identification of genetic polymorphism at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis* 18:641-644.
- Hassett C, Aicher L, Sidhu J and Omiecinski C (1994) Human microsomal epoxide hydrolase: Genetic polymorphism and functional expression *in vitro* of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 3:421-428.
- Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K and Kawajiri K (1991) Genetic linkage of lung cancer-associated *MspI* polymorphism with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1. *J Biochem* 110:407-411.
- Hosgood III H, Menashe I, Shen M, Yeager M, Yuenger J, Rajaraman P, He X, Chatterjee N, Caporasso N, Zhu Y, *et al.* (2008) Pathway-based evaluation of 380 candidate genes and lung cancer susceptibility suggests the importance of the cell cycle pathway. *Carcinogenesis* 29:1938-1943.
- Hung R, Boffeta P, Brockmüller J, Haugen A, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper M, Garte S, Hirvonen A, Anttila S, *et al.* (2003) *CYP1A1* and *GSTM1* genetic polymorphism and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: A pooled analysis. *Carcinogenesis* 24:875-882.
- Hung R, Baragatti M, Thomas D, McKay J, Szeszenia-Dabrowska N, Zaridze D, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, *et al.* (2007) Inherited predisposition of lung cancer: A hierarchical modeling approach to DNA repair and cell cycle control pathways. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:2736-2744.
- Irrarázabal C, Rojas C, Aracena R, Márquez C and Gil L (2003) Chilean pilot study on the risk of lung cancer associated with codon 72 polymorphism in the gene of protein p53. *Toxicol Lett* 144:69-76.
- Kawajiri K (1999) Metabolic polymorphism and susceptibility to cancer. Chapter 15 *CYP1A1*. *IARC Sci Publ* 148:159-172.
- Ketelslegers H, Gottschalk R, Godschalk R, Knaapen AD, Schoten F, Vlietnick F, Kleinjans J and Van Delft J (2006) Interindividual variations in DNA adduct levels assessed by analysis of multiple genetic polymorphism in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:624-629.

- Kiyohara C and Yoshimasu K (2007) Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: A meta-analysis. *Int J Med Sci* 4:59-71.
- Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K and Nakanishi Y (2007) Lung cancer susceptibility: Are we on our way to identifying a high-risk group? *Future Oncol* 3:617-627.
- Kvitko K, Nunes J, Weimer T, Salzano F and Hutz M (2000) Cytochrome *P450IA1* polymorphism in South American Indians. *Hum Biol* 72:1039-1043.
- Lee K, Kang D, Clapper M, Ingelman-Sundberg M, Ono-Kihara M, Kiyohara C, Min S, Lan Q, Le Marchand L, Lin P, *et al.* (2008) *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms, smoking, and lung cancer risk in a pooled analysis among Asian populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:1120-1126.
- Lodovici M, Luceri C, Guglielmi F, Bacci C, Akpan V, Fonnesu M, Boddi V and Dolara P (2004) Benzo(a)pyrene diolepoxide (BPDE)-DNA adduct levels in leukocytes of smokers in relation to polymorphism of *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1* and *mEH*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1342-1348.
- Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK and Bell DA (2000) XPD polymorphism: Effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis* 21:551-555.
- Mohr L, Rodgers K and Silvestri G (2003) Glutathione S-transferase M1 polymorphism and the risk of lung cancer. *Anti-cancer Res* 23:2111-2124.
- Morita S, Yano M, Shiozaki H, Tsujinaka T, Ebisui C, Morimoto T, Kishibuti M, Fujita J, Ogawa A and Taniguchi M (1997) *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1* polymorphism are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 71:192-195.
- Nebert D and Dalton T (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6:947-960.
- Pérez-Morales R, Castro-Hernández C, Gonsebatt M and Rubio J (2008) Polymorphism of *CYP1A1*2C*, *GSTM1*0*, and *GSTT1*0* in a Mexican Mestizo population: A similitude analysis. *Hum Biol* 80:457-465.
- Pharoah P, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern R, Easton D and Ponder B (2002) Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* 31:33-36.
- Proctor R (2001) Tobacco and the global lung cancer epidemic. *Nat Rev Cancer* 1:82-86.
- Quinoñes L, Lucas D, Godoy J, Cáceres D, Berthou F, Varela N, Lee K, Acevedo C, Martínez L, Aguilera A, *et al.* (2001) *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1* genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Lett* 174:35-44.
- Ruiz-Godoy L, Rizo P, Sánchez F, Osornio-Vargas A, García-Cuellar C and Meneses A. Mortality due to lung in Mexico. *Lung Cancer* 58:184-190.
- Salam M, Lin P, Avol E, Gauderman J and Gilliland F (2007) Microsomal epoxide hydrolase, glutathione S-transferase P1, traffic and childhood asthma. *Thorax* 62:1050-1057.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1987) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y..
- Shah P, Singh A, Singh M, Mathur N, Pant M, Mishra B and Parmar D (2008) Interaction of cytochrome *P450IA1* genotypes with other risk factors and susceptibility to lung cancer. *Mutat Res* 639:1-10.
- Shaw G, Falk R, Frame J, Weiffenbach B, Nesbitt J, Pass H, Caporaso N, Moir D and Tucker M (1998) Genetic polymorphism of *CYPD6* and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:215-219.
- Smith C and Harrison D (1997) Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350:630-633.
- Sobti R, Kaur P, Kaur S, Janmeja A, Jindal S, Kishan J and Raimondi S (2008) Combined effect of *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphism on histological subtypes of lung cancer. *Biomarkers* 13:282-295.
- Taioli E, Ford J, Trachman J, Li Y, Demopoulos R and Garte S (1998) Lung cancer risk and *CYP1A1* genotype in African Americans. *Carcinogenesis* 19:813-817.
- Vineis P, Manuguerra M, Kavvoura F, Guarrera S, Allione A, Rosa F, Di Gregorio A, Polidoro S, Saletta F, Ioannidis J, *et al.* (2009) A field synopsis on low-penetrance variants in DNA repair genes and cancer susceptibility. *J Natl Cancer Inst* 101:24-36.
- Voho A, Metsola K, Anttila S, Impivaara O, Järvisalo J, Vainio H, Husgafvel-Pursiainen K and Hirvonen A (2006) *EPHX1* gene polymorphism and individual susceptibility to lung cancer. *Cancer Lett* 237:102-108.
- Wang L, Habuchi T, Takahashi T, Mitsumori K, Kamamoto T, Kakei Y, Kakinuma H, Sato K, Nakamura A, Ogawa O, *et al.* (2002) *Cyclin D1* gene polymorphism is associated with an increased risk of urinary bladder cancer. *Carcinogenesis* 23:257-264.
- Xie Y and Minna J (2008) Predicting the future for people with lung cancer. *Nat Med* 14:812-813.
- Yoon K, Kim J, Gil H, Hwang H, Hwangbo B and Lee J (2008) *CYP1B1*, *CYP1A1*, *MPO*, and *GSTP1* polymorphism and lung cancer in never-smoking Korean women. *Lung Cancer* 60:40-46.
- Zhan P, Wang J, Zhang Y, Qiu L, Zhao S, Qian Q, Wei S, Yu L and Song Y (2010) *CYP2E1 Rsa I/Pst I* polymorphism is associated with lung cancer risk among Asians. *Lung Cancer* 69:19-25.
- Zhou W, Liu G, Thurston S, Xu L, Miller D, Wain J, Lynch T, Su L and Christiani DC (2002) Genetic polymorphism in N-acetyltransferase-2 and microsomal epoxide hydrolase, cumulative cigarette smoking, and lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:15-21.
- Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland L, Phillips DH, Canzian F and Haugen A (2006) Polymorphism of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 27:560-567.

Internet Resources

GenePop statistical package, <http://genepop.curtin.edu.au> (October 5, 2010).

Associate Editor: Emmanuel Dias Neto

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.