



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

# Estudi dels polimorfismes genètics de les glutatió S-transferases (GSTM1, GSTM3, GSTT1 i GSTP1) i de l'epòxid hidrolasa microsomal (EPHX1) com a factors moduladors dels efectes carcinogènics

Maria Esther Piqué Benages

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**ESTUDI DELS POLIMORFISMES GENÈTICS DE LES GLUTATIÓ  
S-TRANSFERASES (GSTM1, GSTM3, GSTT1 I GSTP1) I DE  
L'EPÒXID HIDROLASA MICROSOMAL (EPHX1) COM A  
FACTORS MODULADORS DELS EFECTES CARCINOGENÈCS.**

**Maria Esther Piqué Benages**

Universitat de Barcelona

Divisió de Ciències de la Salut

Departament de Salut Pública

Directors: Dr. Jacint Corbella i Corbella

Dr. Jordi To i Figueras

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701098619

A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized 'M' or similar character.

# ABREVIATURES

**3-MC:** 3-metilcolantrè

**A:** adenina

**ADN:** àcid desoxirribonucleic

**ARN:** àcid ribonucleic

**AS-PCR:** allele specific PCR

**BPDE:** benzo[a]pirè-7,8-dihidrodiol-9,10-epòxid

**C:** citosina

**DMSO:** dimetilsulfòxid

**dNTPs:** desoxinucleòtidstrifostaf

**EDTA:** àcid etilendiaminotetraacètic

**FIS:** Fondo de Investigaciones Sanitarias

**G:** guanina

**g.l.:** graus de llibertat

**GS:** anió tiolat

**GSH:** glutatió

**GST:** glutatió S-transferasa

**HPA:** hidrocarburs policíclics aromàtics

**IARC:** International Agency for Research on Cancer (Agència Internacional per a la Recerca del Càncer)

**IC:** interval de confiança

**mEH:** epòxid hidrolasa microsomal

**MPOC:** malaltia pulmonar obstructiva crònica

**MVR:** minisatellite variant repeat

**NAT:** N-acetiltransferasa

**NSCLC** non-small cell lung cancer (Càncer de pulmó de cèl·lules no petites)

**OMS:** Organització Mundial de la Salut

**OR:** odds ratio

**pb:** parell de bases

**PCR:** Polymerase chain reaction (Reacció en cadena de la polimerasa)

**PI:** punt isoelèctric

**PM:** pes molecular

**PSA:** persulfat amònic

**RFLP:** restriction fragments length polymorphisms (Polimorfismes de longitud de fragments de restricció)

**SAM:** S-adenosin metionina

**SCLC:** small cell lung cancer (Càncer de pulmó de cèl·lules petites)

**SNP:** single nucleotide polymorphism (Polimorfismes nucleotídics senzills)

**STR:** short tandem repeats

**T:** timina

**TBE:** tris borat EDTA

**TEMED:** N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina

**TRIS:** tris(hidroximetil)aminometà

**UDPGA:** àcid uridinfosfatglucurònic

**UDPGT:** UDP-glucuroriltransferases

**VNTR:** variable number of tandem repeats (Nombre variable de repeticions en tàndem)



<b>I. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
1. Introducció	3
<b>II. ANTECEDENTS I ESTAT ACTUAL</b>	<b>5</b>
<b>2. El càncer d'origen tòxic</b>	<b>7</b>
2.1. Fisiopatologia del càncer	7
2.1.1. Progressió tumoral	8
2.1.2. Herència del càncer	9
2.1.3. Agents cancerígens	9
2.2. Carcinogènesi química	10
2.2.1. Mecanismes de carcinogènesi química	10
2.2.1.1. Adductes	10
2.2.1.2. Punts calents de mutació	11
2.2.2. Carcinògens químics	12
2.2.2.1. Nitrosamines	12
2.2.2.2. Hidrocarburs policíclics aromàtics	13
<b>3. El tabac</b>	<b>18</b>
3.1. Epidemiologia	18
3.2. Legislació	20
3.3. Composició química	20
3.3.1. Composició del fum del tabac	21
- 3.3.1.1. Principals components del fum del tabac	21
3.3.2. Corrent principal i corrent secundari	22
3.4. Efectes tòxics del tabac	24
3.4.1. Nicotina	24
3.4.1.1. Toxicocinètica	25
3.4.1.2. Toxicodinàmia	26
3.4.2. Monòxid de carboni	27
3.4.2.1. Acció	27
3.4.3. Substàncies irritants	27
3.4.4. Substàncies cancerígenes i co-cancerígenes	28
3.5. Patologia tòxica per tabac	28

---

3.5.1. Malalties respiratòries	28
3.5.2. Malalties cardiovasculars	29
3.5.3. Malalties de l'aparell digestiu	29
3.5.4. Altres malalties	30
3.6. Càncer en fumadors	30
3.6.1. El fum del tabac com a mescla carcinogènica	31
3.6.1.1. Substàncies carcinògeniques presents en el fum del tabac	31
3.6.2. Tipus de càncers associats al tabac	32
3.6.2.1. Càncer de pulmó	32
3.6.2.2. Càncer de laringe	35
3.6.2.3. Altres càncers	35
3.7. El tabac durant la gestació	36
3.8. El fumador passiu	36
<b>4. Polimorfismes metabòlics i la seva base genètica</b>	<b>37</b>
4.1. El metabolisme dels tòxics	37
4.1.1. Metabolisme de fase I	39
4.1.1.1. Sistema de les monooxigenases microsòmals	39
4.1.1.2. Hidròlisis	40
4.1.2. Metabolisme de fase II	40
4.1.2.1. Glucuronització	40
4.1.2.2. Conjugació amb grups sulfat	40
4.1.2.3. Metilació	40
4.1.2.4. Acilacions	40
4.1.2.5. Conjugació amb glutatió	41
4.1.2.6. Altres conjugacions	41
4.2. Polimorfismes metabòlics	41
4.2.1. N-acetiltransferasa	41
4.2.2. Citocrom P450	42
4.2.2.1. Isoenzim P4501A1 (CYP1A1)	42
4.2.2.2. Isoenzim P4502A6 (CYP2A6)	42

4.2.2.3. Isoenzim P4502D6 (CYP2D6)	42
4.3. Polimorfismes genètics	43
4.3.1. Tipus de polimorfismes genètics	44
4.3.1.1 Fragments de restricció de tamany polimòrfic	44
4.3.1.2. Polimorfisme nucleotídic senzill (SNP)	44
4.3.1.3. Minisatèl·lits i microsatèl·lits	45
4.3.1.4. Polimorfisme de tamany i de seqüència	45
4.4. Dels polimorfismes metabòlics als polimorfismes genètics	45
<b>5. Les Glutatió S-transferases</b>	<b>46</b>
5.1. Família d'enzims solubles	47
5.1.1. Isoenzims citosòlics	47
5.1.2. Nomenclatura	47
5.1.3. Funcions	48
5.1.4. Distribució	49
5.1.5. Estructura	49
5.1.6. Mecanisme d'acció catalític	50
5.1.7. Substrats	50
5.1.8. Activitat peroxidasa	51
5.1.9. Inducció i regulació de l'expressió	51
5.2. Isoenzims i polimorfismes	51
5.2.1. Classe alfa	52
5.2.2. Classe kappa	52
5.2.3. Classe mi	52
5.2.3.1. GSTM1-1	53
5.2.3.2. GSTM3-3	54
5.2.4. Classe omega	54
5.2.5. Classe pi	54
5.2.6. Classe sigma	55
5.2.7. Classe theta	55
5.2.8. Classe zeta	56
<b>6. Epòxid hidrolasa</b>	<b>56</b>
6.1. Epòxid hidrolasa microsomal	57

---

6.1.1. Funció	57
6.1.2. Distribució	58
6.1.3. Proteïna	58
6.1.4. Substrats i inhibidors	59
6.1.5. Mecanisme d'acció	59
6.1.6. Gen EPHX1	60
6.2. Polimorfismes de l'epòxid hidrolasa microsomal	61
6.2.1. Polimorfismes a la regió codificant	61
6.2.2. Polimorfismes a la regió no codificant	62
6.2.3. Efecte dels polimorfismes sobre l'activitat de l'enzim	63
<b>7. Polimorfismes genètics i susceptibilitat al càncer</b>	<b>63</b>
7.1. Polimorfismes de les GST i relació amb el càncer	63
7.1.1. GSTM1	64
7.1.2. GSTT1	65
7.1.3. GSTM3	65
7.1.4. GSTP1	66
7.1.5. Risc associat a la combinació de polimorfismes	66
7.2. Relació entre els polimorfismes de la mEH i càncer	68
7.2.1. Càncer de pulmó	68
7.2.2. Càncer de laringe	69
7.2.3. Altres tipus de càncer	70
<b>III. OBJECTIUS</b>	<b>71</b>
<b>8. Objectius</b>	<b>73</b>
<b>IV. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>75</b>
<b>9. Disseny de l'estudi</b>	<b>77</b>
9.1. Descripció de la mostra	77
9.1.1. Fumadors control	78
9.1.2. Malalts de càncer de pulmó	79
9.1.3. Malalts de càncer de laringe	81

9.2. Recepció de les mostres	82
<b>10. Mètodes de laboratori</b>	<b>83</b>
10.1. Obtenció de l'ADN	83
10.2. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	85
10.2.1. Components de la PCR	86
10.2.1.1. Oligonucleòtids	86
10.2.1.2. Tampons	86
10.2.1.3. Taq ADN polimerasa	87
10.2.1.4. dNTPs	87
10.2.1.5. Seqüència diana	87
10.2.1.6. Altres components addicionals	87
10.3. Electroforesi d'ADN	88
10.3.1. Electroforesi en gels d'agarosa	88
10.3.2. Electroforesi en gels de poliacrilamida	88
10.4. Identificació del polimorfismes	89
10.4.1. Digestió amb enzims de restricció	89
10.4.2. AS-PCR	90
10.4.3. Polimorfismes de tamany	91
10.5. Anàlisi del polimorfismes	91
10.5.1. Polimorfisme GSTM1	92
10.5.2. Polimorfisme GSTM3	95
10.5.2.1. Mètode A: PCR-RFLP	96
10.5.2.2. Mètode B	98
10.5.3. Polimorfisme GSTT1	100
10.5.4. Polimorfisme GSTP1	101
10.5.5. Polimorfisme EPHX1 exó3	103
10.5.5.1. Mètode A: PCR-RFLP	104
10.5.5.2. Mètode B: AS-PCR	106
10.5.6. Polimorfisme EPHX1 exó4	108
<b>11. Mètodes d'anàlisi estadística</b>	<b>110</b>
11.1. Estudi de l'equilibri genètic	110
11.2. Estudi del desequilibri de lligament	112

11.3. Mesures d'associació	112
11.3.1. Raó d'odds	112
<b>V. RESULTATS</b>	<b>117</b>
<b>12. Estudi de freqüències</b>	<b>119</b>
12.1. Resultats del polimorfisme GSTM1	119
12.2. Resultats del polimorfisme GSTT1	124
12.3. Resultats del polimorfisme GSTM3	127
12.4. Resultats del polimorfisme GSTP1	131
12.5. Resultats del polimorfisme EPHX1 exó3	135
12.6. Resultats del polimorfisme EPHX1 exó4	142
<b>13 Estudi del desequilibri de lligament</b>	<b>146</b>
13.1. Desequilibri entre GSTM1 i GSTM3	146
13.2. Desequilibri entre EPHX1 exó3 i GSTM1	149
13.3. Desequilibri entre GSTM1 i EPHX1 exó4	150
13.4. Desequilibri entre EPHX1 exó3 i GSTM3	151
13.5. Desequilibri entre GSTM3 i EPHX1 exó4	152
13.6. Desequilibri entre els exons 3 i 4 del gen EPHX1	153
<b>14. Estudi de la modulació del risc de càncer de pulmó pels polimorfismes de les GST i mEH</b>	<b>154</b>
14.1. Estudi de tota la població	154
14.2. Estudi considerant només la població masculina	163
14.3. Estudi de la interacció amb el tabac	167
<b>15. Estudi de la modulació del risc de càncer de laringe pels polimorfismes de les GST i mEH</b>	<b>173</b>
15.1. Estudi de tota la població	173
15.2. Estudi considerant només la població masculina	182
15.3. Estudi de la interacció amb el tabac	186
<b>VI. DISCUSSIÓ</b>	<b>193</b>
<b>16. Mètodes i freqüències</b>	<b>195</b>
16.1. Mètodes	195

16.1.1. Mètode d'estudi del polimorfisme del gen GSTM3	195
16.1.2. Mètodes d'estudi dels polimorfismes dels gens GSTP1 i EPHX1 a l'exó4	196
16.1.3. Mètode d'estudi del polimorfisme del gen EPHX1 a l'exó3	196
16.2. Estudi de freqüències	199
16.2.1. Freqüències poblacionals	199
16.2.2. Desequilibri de lligament	200
<b>17. Els polimorfismes de les GST i mEH i la seva relació amb el càncer de pulmó i de laringe</b>	<b>201</b>
17.1. GSTM1	201
17.2. GSTT1	204
17.3. GSTM3	205
17.4. GSTP1	206
17.5. EPHX1 exó3 i exó4 i activitat de la mEH	208
17.6. Combinació de polimorfismes	210
17.7. Consideracions finals	212
<b>VII. CONCLUSIONS</b>	<b>215</b>
18. Conclusions	217
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>223</b>

# **I. INTRODUCCIÓ**



# 1. INTRODUCCIÓ

La majoria dels processos cancerígens són esporàdics (adquirits), és a dir que no estan relacionats amb l'herència, i solen estar causats per l'exposició a agents carcinògens. Tant el càncer de pulmó com el de laringe en són un exemple en l'etiologia d'aquests dos tipus de càncer destaca el fum del tabac com a principal factor involucrat en el desenvolupament del càncer de pulmó i com un factor molt important en el de laringe.

El fum del tabac és una barreja complexa, en la que hi han identificats aproximadament de 4.000 a 6.000 compostos diferents (IARC, 1986). Entre ells es troben productes químics d'elevada carcinogenitat com és el cas dels hidrocarburs policíclics aromàtics. Molts d'aquests compostos, els qual esdevenen també contaminants ambientals, estan en forma de precarcinògens, és a dir que necessiten patir un procés de bioactivació endògena per adquirir el potencial tòxic i esdevenir els veritables responsables de la mutagènesi, activació oncogènica i inici del procés de carcinogènesi.

La bioactivació dels precarcinògens del fum del tabac, així com la dels contaminants ambientals, té lloc a través del metabolisme dels propis tòxics dins de l'organisme, en el qual hi han implicats enzims com els citocroms P450 o l'epòxid hidrolasa que pertanyen al metabolisme de fase I. La família de les glutatió S-transferases (GSTs), enzims que pertanyen al metabolisme de fase II, intervenen en la desactivació dels metabòlits electròfils generats en les reaccions de fase I.

Els polimorfismes genètics dels enzims implicats en la biotransformació són un dels majors factors involucrats en la variabilitat individual en el metabolisme dels xenobiòtics, modificant el balanç activació/desactivació del tòxics i esdevenint, potser, factors moduladors dels efectes carcinogènics. En la present tesi s'estudiaran els gens polimòrfics de les glutatió-S-transferases (EC 2.5.1.18): GSTM1, GSTM3, GSTT1, GSTP1 i el de l'epòxid hidrolasa microsomal (EC 3.3.2.3) EPHX1 en els exons 3 i 4, en una població de malalts de càncer de pulmó, una població de

malalts de càncer de laringe i una població de fumadors sans. L'anàlisi dels polimorfismes genètics es realitzarà per PCR en l'ADN extret a partir de leucòcits obtinguts de sang perifèrica. Mitjançant l'anàlisi de freqüències l'objectiu és esclarir la possible implicació d'aquests polimorfismes en la modulació de la susceptibilitat al càncer de pulmó i de laringe.

## **II. ANTECEDENTS I ESTAT ACTUAL**

## 2. EL CÀNCER D'ORIGEN TÒXIC

### 2.1. FISIOPATOLOGIA DEL CÀNCER

El càncer és un grup de malalties que es caracteritzen per un creixement cel·lular incontrolat que dona lloc a la invasió dels teixits del voltant i s'estén a altres parts del cos, el que representa una alteració de la pauta del comportament més fonamental de les cèl·lules en un organisme pluricel·lular. És el resultat d'una sèrie d'accidents genètics subjectes a selecció natural, pel que no és probable que es produeixin dos casos de càncer genèticament idèntics malgrat que siguin la mateixa malaltia. A la majoria de casos l'acumulació d'errors en la maquinària cel·lular que condueix al càncer té lloc després del naixement i en les cèl·lules somàtiques, però també existeixen excepcions en les que s'hereten els errors via cèl·lules germinals. Els càncers que s'originen a partir de cèl·lules diferents són malalties diferents (Alberts et al., 1996).

Quan es parla de tumor es fa referència a una massa de cèl·lules anormals creixent inexorablement. El tumor pot ser:

1. **Benigne:** les cèl·lules romanen agrupades en una única massa, creixen per expansió però sempre queden restringides en el lloc on apareix el tumor, no tenen capacitat d'invasió. Conserven un elevat grau de diferenciació i mantenen les característiques de la cèl·lula originària.
2. **Maligne:** les cèl·lules tenen la capacitat d'envair teixits circumdants i poden donar lloc a metàstasi (capacitat d'alliberar-se i entrar al torrent sanguini o vasos limfàtics i formar tumors secundaris). Com més malignes són, més desdiferenciades estan les cèl·lules. Tenen un creixement més ràpid que els benignes.

El que diferencia un tumor benigne d'un tumor maligne és l'adquisició de la capacitat invasiva que dona lloc a la metàstasi

### 2.1.1. PROGRESSIÓ TUMORAL

El càncer és el resultat de múltiples mutacions que tenen com a dianes gens crítics per a la divisió cel·lular normal i per a la mort cel·lular. Una única mutació no és suficient per transformar la cèl·lula normal a cancerosa, es requereixen varis successos, cadascun d'ells de molt baixa probabilitat, acumulats en una mateixa cèl·lula o clon cel·lular per a la transformació. El fet d'acumular aquests successos és més important que l'ordre en el que tenen lloc (Macdonald & Ford, 1997).

Una sola cèl·lula anormal genera un tumor però aquesta anormalitat ha de ser hereditària, ha de ser un canvi heretable. Aquesta anomalia heretable pot ser deguda a un **canvi genètic** (alteració de la seqüència de l'ADN de la cèl·lula) o bé un **canvi epigenètic** (canvi en la pauta d'expressió gènica sense canvi en la seqüència de l'ADN). La majoria dels càncers s'originen a partir de canvis genètics que poden estar influenciats o no per factors epigenètics.

Al principi es produeix una alteració, un canvi en el material genètic, la cèl·lula però, conserva el fenotip normal, no manifesta cap alteració morfològica. A mesura que es van produint noves mutacions i que aquestes afecten a gens implicats en el control de la proliferació cel·lular es produeix l'expansió clonal d'aquestes cèl·lules. Posteriors mutacions proporcionaran les característiques invasives. Cadascun d'aquests esdeveniments successius fan que les cèl·lules siguin cada vegada més inestables i per tant s'augmenta el risc de noves mutacions. En un càncer ja desenvolupat es continuen generant errors en les cèl·lules, els càncers contínuament estan canviant el seu comportament, el que crea problemes pel que fa al tractament (King, 1996).

Per a que un tumor pugui créixer sense límits s'han de complir altres requisits com que les cèl·lules tumorals han d'estimular el desenvolupament de nous vasos sanguinis (angiogènesi) que els hi proporcionaran els nutrients i l'oxigen necessari per créixer.

Cadascuna de les etapes implicades en el desenvolupament del càncer està governada per múltiples factors, alguns d'ells són dependents de la constitució genètica de l'organisme i altres de l'entorn o del tipus de vida.

## 2.1.2. HERÈNCIA DEL CÀNCER

Des d'aquest punt de vista podem classificar els càncers en tres grups (King, 1996) :

**1. Càncers esporàdics:** on es troben la majoria (més del 90%) de tots els càncers; estan causats per factors ambientals, com agents químics, radiacions o virus, que causen mutacions en cèl·lules somàtiques. No presenten evidència de relació familiar hereditària.

**2. Càncers amb una relació familiar feble:** representen un 5-10%. Les alteracions estan presents en les cèl·lules germinals i aquestes alteracions augmenten el risc de desenvolupar càncer.

Exemples: **HNPCC** (hereditary non-polyposis colon cancer) i l'**APC** (poliposis adenomatosa familiar), a més aquesta malaltia presenta alteracions en uns gens que també es troben alterats en la forma esporàdica de la malaltia. No és el cas del **càncer de mama** el qual està causat en la seva forma heretada per alteracions en els gens BRCA1 i BRCA2, en canvi en la seva forma esporàdica no s'han trobat defectes en aquests gens.

**3. Càncers amb una forta relació familiar:** representen un 0.1% del total. Es desenvolupen durant la infantesa i són causats per una inactivació dels dos al·lels que codifiquen per un gen supressor de tumor. El fet que es desenvolupi en nens fa pensar que els canvis necessaris per desenvolupar en càncer són pocs.

Exemples: **retinoblastoma, tumor de Wilm i síndrome de Li-Fraumeni.**

Les formes heretables es desenvolupen a unes edats més primerenques que les esporàdiques.

## 2.1.3. AGENTS CANCERÍGENS

Els agents cancerígens poden ser classificats en genètics o en epigenètics en funció de si produeixen una alteració en la seqüència de l'ADN de la cèl·lula o no.

La correlació entre carcinogènesi (generació del procés de càncer) i mutagènesi (producció d'un canvi en la seqüència de l'ADN) està clara per tres tipus d'agents:



- **Carcinògens químics:** causen canvis locals en la seqüència dels nucleòtids. Alguns exemples són: hidrocarburs policíclics aromàtics, amines aromàtiques, crom, clorur de vinil, benzè, etc.
- **Radiacions ionitzants:** causen ruptura dels cromosomes i translocacions.
- **Virus:** introdueixen ADN aliè dins la cèl·lula: virus d'Epstein-Barr, virus de l'hepatitis B, virus limfotrópic humà, etc.

## 2.2. CARCINOGENÈSI QUÍMICA

El desenvolupament del càncer és un procés amb múltiples etapes, múltiples mutacions i múltiples mecanismes, que pot ser induït per productes químics mutagènics i no-mutagènics, i que pot ser influenciat per productes químics no carcinògens.

### 2.2.1. MECANISMES DE CARCINOGENÈSI QUÍMICA

#### 2.2.1.1. ADDUCTES

Els compostos químics que tenen grups electròfils a la seva molècula o grups que mitjançant el metabolisme es poden convertir en electròfils, poden formar unions covalents amb grups nucleòfils (com els grups amino, hidroxil, sulfidril) d'altres molècules, aquesta unió dona lloc als **adductes** (King, 1996).

L'ARN, l'ADN i les proteïnes tenen en les seves molècules grups nucleòfils i per tant són susceptibles a la formació d'adductes. L'ADN no sempre presenta la mateixa accessibilitat, si les seves dues cadenes formen la doble hèlix es més difícil accedir a les bases individuals, però durant la síntesi aquestes cadenes es separen i l'ADN esdevé més vulnerable. Un cop s'ha format l'adducte covalent es produeix una distorsió en l'estructura de l'ADN. Si aquest no es repara, dona lloc a una mutació ja que una base errònia es introduïda en la nova cadena. Diferents carcinògens formen diferents adductes que generen mutacions diferents (King, 1996).

### 2.2.1.2. PUNTS CALENTS DE MUTACIÓ

Quan s'estudia el comportament d'una regió gènica determinada enfront a les mutacions, s'observa que aquestes no tenen lloc a l'atzar sinó que existeixen llocs en el gen que són més susceptibles a la mutació que d'altres, aquests llocs són anomenats "**punts calents de mutació**" (*hotspots*) (Lewin, 1997).

El fet que els mutàgens no actuen a l'atzar va ser descrit fa uns 30 anys (Vineis et al., 1999). Els carcinògens deixen la seva empremta o un espectre de mutacions característic en els gens relacionats amb el càncer com els oncogens o els gens supressors de tumors que es pot caracteritzar en funció del codó al que afecta i del tipus de mutació. Els dinucleòtids CpG són una diana d'aquests compostos i la substitució d'un canvi de base és el canvi més específic (Lewin, 1997). Els dinucleòtids CpG són punts calents de mutació també per la seva tendència a metilar-se, l'alteració de la pauta de metilació de l'ADN augmenta la inestabilitat genètica i altera l'expressió gènica. En el càncer s'ha observat que existeix una desregulació del patró de metilació.

Aproximadament la meitat dels càncers humans tenen mutacions en la p53, en el cas concret del càncer de pulmó existeix un gran nombre de transversions G→T, alguns dels seus punts calents de mutació estan localitzats en els codons 157, 248 i 273, que corresponen a aminoàcids presents en el domini d'unió a l'ADN de la proteïna. També el codó 179 és un punt calent de mutació. El codó 157 és característic del càncer de pulmó i no és un punt calent per cap altre càncer, en canvi els codons 248 i 273 estan implicats en molts altres càncers (Denisenko et al., 1996).

El punt calent de mutació del gen de la p53 en l'hepatocarcinoma està situat al codó 249 on el 50% del pacients tenien una transversió G→T (Freedman, 1999).

Existeixen punts calents de mutació espontània i punts calents de mutació induïda, a vegades coincideixen però a vegades no (Griffiths et al., 1995).



## **2.2.2. CARCINÒGENS QUÍMICS**

Un carcinogen és qualsevol agent que per les seves propietats, físiques o químiques, pot induir la transformació de cèl·lules normals a cancerígenes, es a dir que pot induir càncer.

Els carcinògens químics són un grup de compostos naturals o sintètics, amb estructura diversa de caràcter orgànic o inorgànic. Exemples de carcinògens orgànics són els hidrocarburs policíclics aromàtics, les nitrosamines, amines aromàtiques, hidrazines, carbamats, aflatoxines i els agents alquilants entre d'altres; i d'inorgànics alguns metalls, com l'arsènic i el crom, i complexos de silicat (Li & Heflich, 1991).

El procés cancerigen comença per un canvi en el material genètic, els carcinògens químics poden induir aquest canvi per múltiples mecanismes que van des dels més simples com la interacció directe amb l'ADN, fins a altres més complexes amb més factors implicats però que finalment també donaran lloc a la mutació.

Quatre grups importants de carcinògens químics exerceixen els seus efectes formant adductes: els hidrocarburs policíclics aromàtics (HPA), les amines aromàtiques, les nitrosamines i els agents alquilants (King, 1996).

Dins dels carcinògens químics trobem compostos que són genotòxics per si mateixos i d'altres que necessiten una metabolització prèvia per poder reaccionar amb l'ADN. Molts necessiten ser activats per enzims dependents del citocrom P450 que catalitzen la introducció de grups epòxid o hidroxil. Paral·lelament a aquestes vies d'activació existeixen reaccions d'inactivació d'aquests productes actius formats, de manera que és el balanç d'activació-inactivació el que condiciona finalment la capacitat carcinogènica (King, 1996).

### **2.2.2.1. NITROSAMINES**

L'exposició a les N-nitrosamines esdevé per diferents fonts: tabac, productes cosmètics, aliments fumats i nitrits afegits a l'aliment com a conservants, aquests

últims reaccionen amb les amines i donen lloc a les N-nitrosamines, reacció catalitzada pels àcids de l'estómac o per acció dels bacteris.

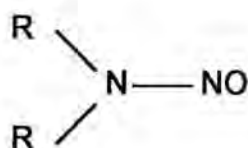


Fig. 2.1. Nitrosamina.

A la via d'activació d'aquests compostos intervé el citocrom P450 el qual oxida el carboni  $\alpha$  de la nitrosamina donant lloc a un intermediari hidroxilat molt inestable que es descomposa en acetaldehid i metildiazohidròxid (agent alquilant). Les nitrosamines sense hidrògens en el carboni  $\alpha$  són inactives. Aquest esquema d'activació és general i poden existir algunes variacions en funció de la nitrosamina de manera que l'activació de les nitrosamines dóna lloc a una varietat d'espècies reactives amb l'ADN (Li & Heflich, 1991).

### 2.2.2.2. HIDROCARBURS POLICÍCLICS AROMÀTICS

Els hidrocarburs policíclics aromàtics (HPA) són una classe molt àmplia de compostos orgànics que contenen tres o més anells aromàtics condensats formats per àtoms de carboni i d'hidrogen.

Van ser caracteritzats com a productes de la piròlisi del carbó i dels olis. El primer HPA que es va aïllar va ser el dibenzantracè al 1924. Són contaminants atmosfèrics ubics. Estem exposats a ells des de diferents fonts: fum del tabac, dieta, medi ambient i medi laboral (Phillips & Sims, 1979; Vollhardt, 1992).

### Cinètica i metabolisme

S'absorbeixen per via respiratòria, digestiva i cutània. Es distribueixen àmpliament per tot l'organisme i es troben en quasi tots els òrgans interns sobretot en els rics en lípids.

Pel que fa al metabolisme, els productes originals es converteixen mitjançant epòxids intermedis en diols, fenols i tetrols, que a la vegada poden conjugarse amb grups sulfat, amb glucurònic i amb glutatió. El metabolisme produeix majoritàriament una desactivació, però alguns dihidrodiols s'activen a espècies que s'uneixen a l'ADN, principalment els diol-epòxids, i poden esdevenir carcinògens. Els metabòlits dels HPA i els seus conjugats s'eliminen per orina i femta però els conjugats que s'excreten per bilis poden hidrolitzar-se per enzims de la flora intestinal i reabsorbir-se.

Els HPA tenen un cicle metabòlic ràpid, no romanen a l'organisme excepte en el cas que hagin format adductes amb l'ADN o proteïnes.

## Exemples

El compost model dels HPA és el fenantrè.

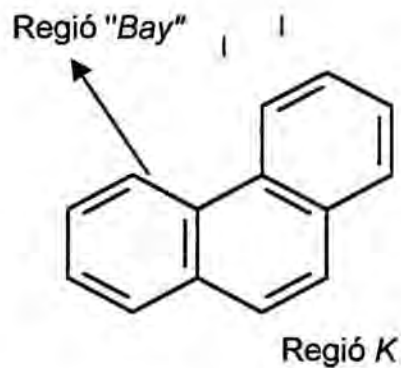


Fig. 2.2. Fenantrè.

Els requeriments per esdevenir carcinogen són: estructura coplanar, tres anells fusionats en la configuració del fenantrè, anells fusionats addicionals (com a mínim un benzè), i/o grups metil a la regió bay (Ruddon, 1990).

Un potent carcinogen present en el fum del tabac és el benzo[a]pirè

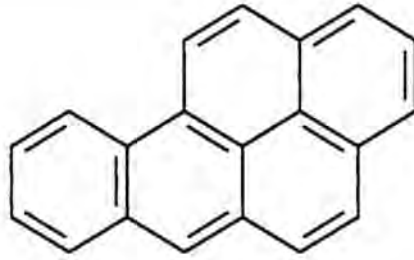


Fig. 2.3. Benzo[a]pirè

Els HPA formen adductes amb les bases púriques especialment amb la guanina, però els hi cal una activació metabòlica per ser carcinògens que en el cas del benzo[a]pirè es mostra a la següent figura (Phillips & Sims, 1979; To-Figueras, 1999):

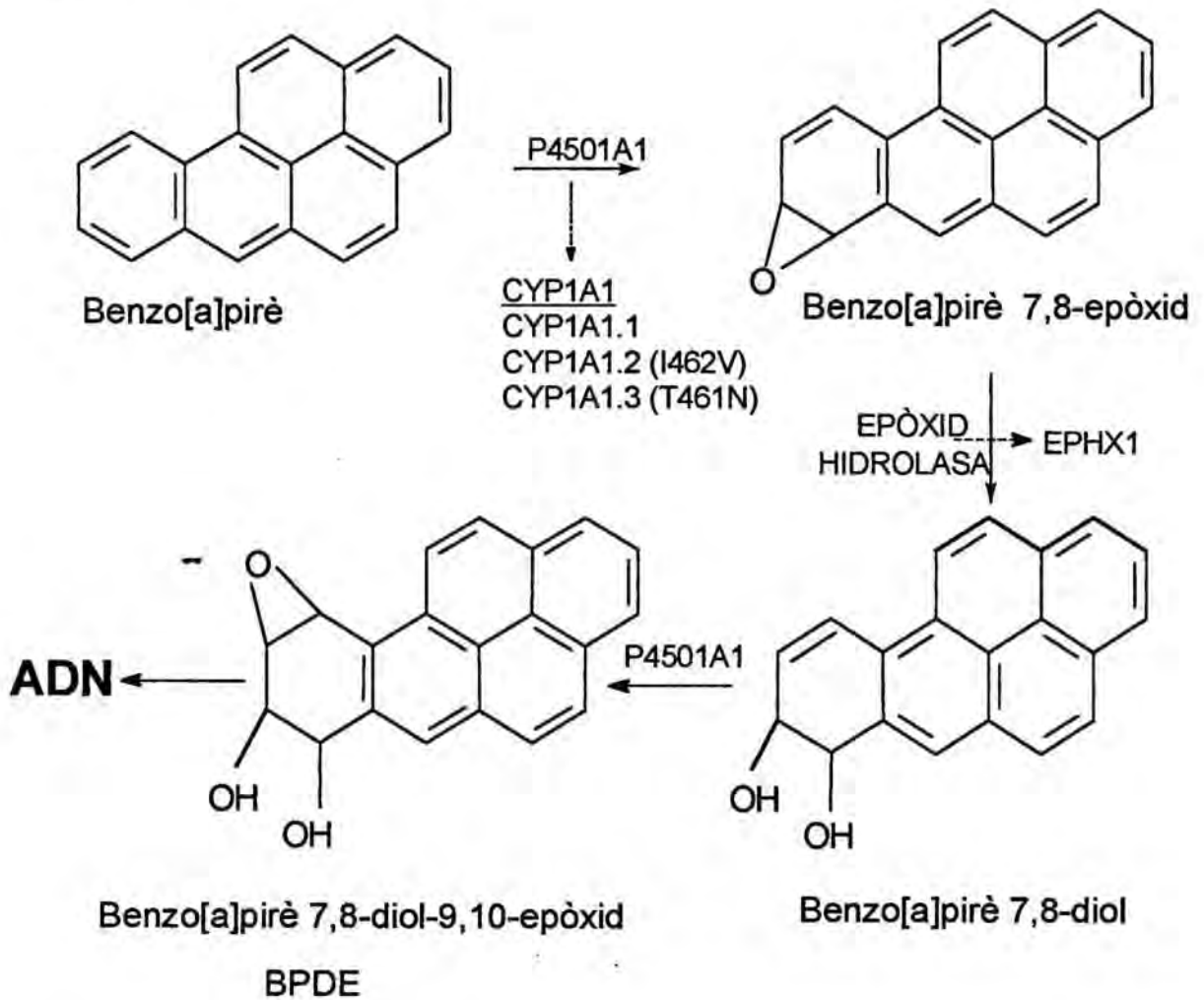


Fig. 2.4. Activació metabòlica del benzo[a]pirè.

Les monooxigenases del citocrom P450 generen un epòxid que es converteix en diol per l'epòxid hidrolasa. Un segon epòxid es forma sovint en la regió *bay* (els epòxids formats en la regió *bay* solen ser molt més reactius) per l'acció de les monooxigenases donant lloc al 7,8-dihidrodiol-9,10-epòxid (BPDE) que ataca covalentment a l'ADN formant adductes (el metabolisme catalitzat pel citocrom P450 i l'epòxid hidrolasa és estereoespecífic) (Phillips & Sims, 1979).

El benzo[a]pirè pot seguir altres vies metabòliques per donar lloc a productes diferents del BPDE.

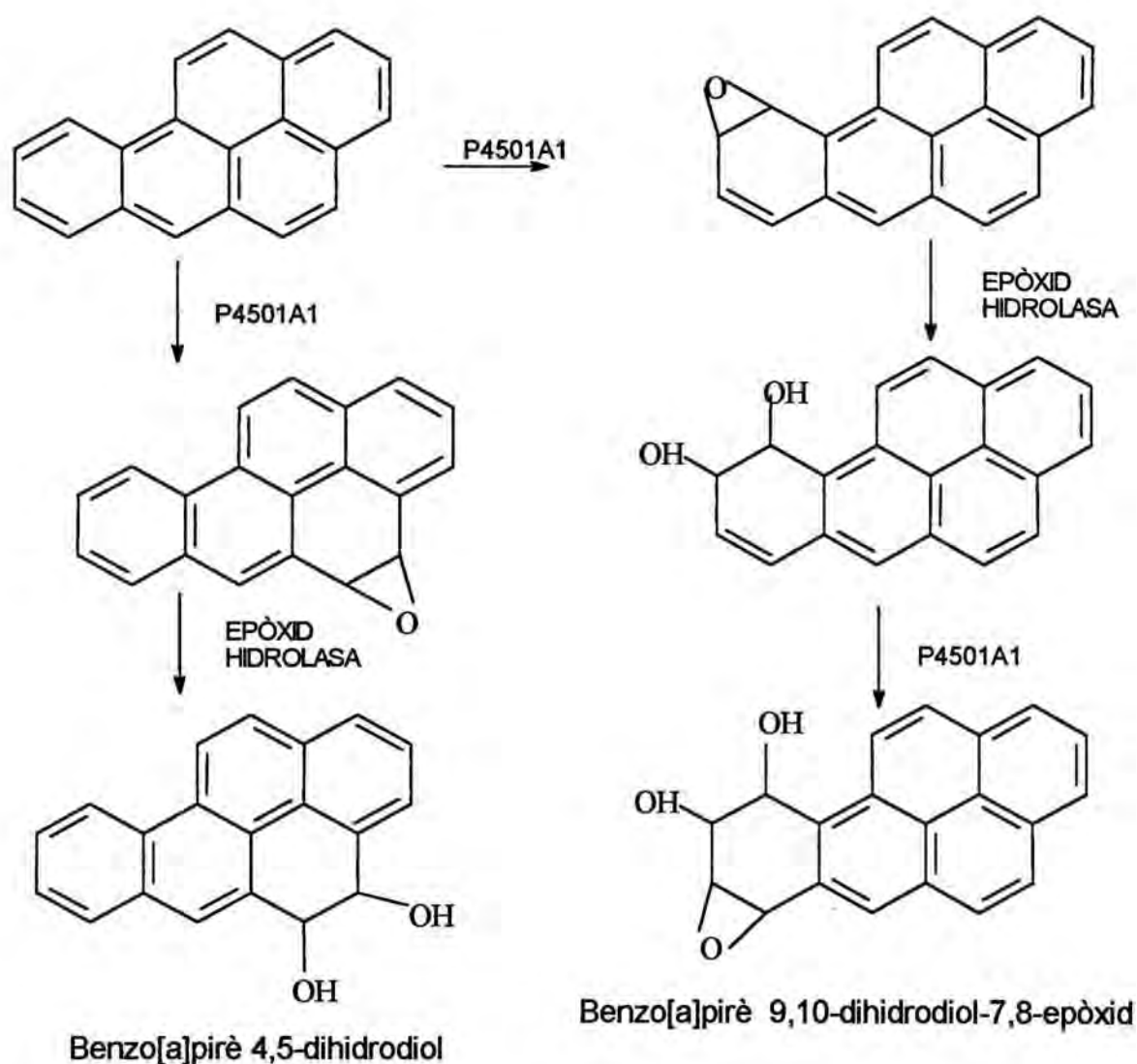


Fig. 2.5. Altres vies metabòliques del benzo[a]pirè.

El BPDE pot ser inactivat per conjugació amb glutatió mitjançant l'acció de les glutatió S-transferases, impedit així la seva unió a l'ADN (Hayes & Pulford, 1995).

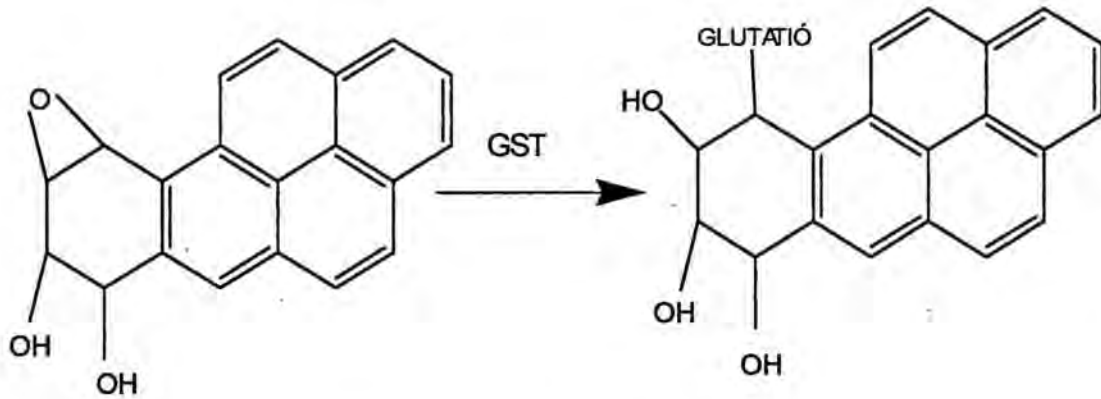


Fig. 2.6. Conjugació del BPDE amb el glutatió.

Els adductes de BPDE es formen principalment en les posicions 2-amino de la guanina o 4-amino de l'adenina (el BPDE s'uneix a la guanina amb molta més eficiència que a l'adenina) (Denisenko et al., 1996).

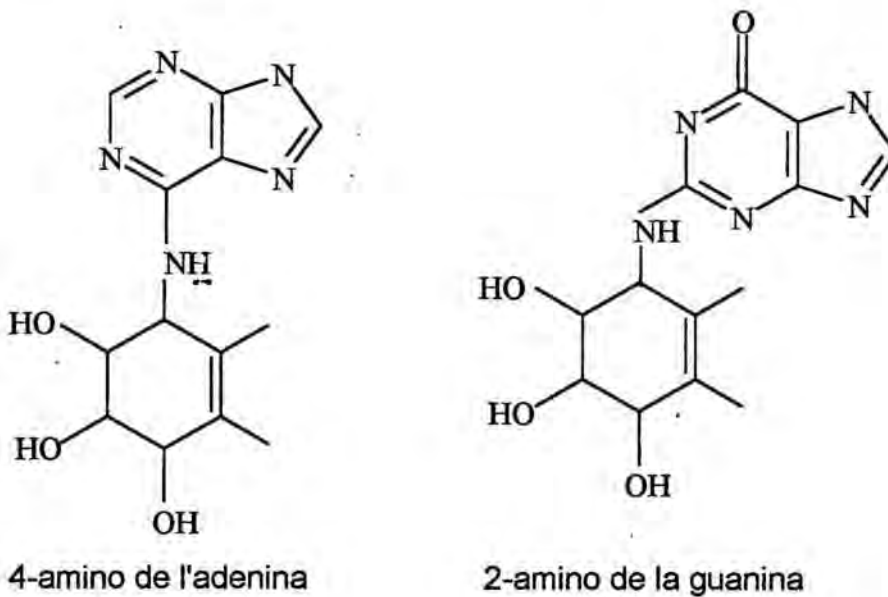


Fig. 2.7. Adductes de BPDE.



Els adductes BPDE-ADN solen ser reparats pel mecanisme d'escissió de nucleòtid, si aquest falla els adductes poden bloquejar la transcripció de gens essencials i produeixen canvis en la estructura de la cromatina (Wei et al., 1996). Si s'analitza l'empremta que deixa el BPDE en el gen de la p53 s'observa que el tipus de mutació que provoca majoritàriament són transversions G→T localitzades preferencialment en els codons 157, 248 i 273 (Denisenko et al., 1996).

Per la coincidència dels punts calents de mutació en el gen de la p53 i els adductes produïts pel BPDE en aquest gen es pot afirmar que el tabac amb el seu metabòlit BPDE està implicat en les mutacions de la p53 que donaran lloc al càncer de pulmó (Denisenko et al., 1996; To-Figueras, 1999).

## **3. EL TABAC**

### **3.1. EPIDEMIOLOGIA**

Avui en dia el consum de tabac és responsable d'una elevada taxa de morbiditat i mortalitat, se'l relaciona amb més de 25 malalties. Constitueix la primera causa de pèrdua de salut i la primera causa de mort prematura i evitable en els països desenvolupats. A nivell mundial l'hàbit tabàquic és el responsable d'uns 3 milions de morts anuals i d'uns 26 milions d'anys potencials de vida perduts (Pardell, 1999).

A Catalunya el pla de salut 1996-1998 va fer una estimació de 8.400 morts anuals, es a dir un 16.3% de la mortalitat total (Pardell, 1999).

El fumador passiu també constitueix un problema seriós de salut pública. L'exposició al tabac genera morbiditat i mortalitat en la població no fumadora

A principis dels anys 90 uns 1.100 milions de persones consumien tabac (un terç de la població adulta mundial aproximadament). S'estima que fumen el 42% dels homes i el 24% de les dones en els països desenvolupats i un 48% dels homes i el 7% de les dones en els països en desenvolupament. Concretament a Catalunya un de cada tres ciutadans són fumadors actius i molts dels no fumadors actius són fumadors passius (Salleras et al., 1994).

En un estudi (Pardell et al., 1996) on es feia un seguiment sobre l'evolució de l'hàbit tabàquic a Catalunya durant els anys 1982-1994, s'observà una tendència decreixent a l'ús del tabac. Aquesta tendència global variava, però, segons el sexe, ja que mentre que en els homes sí s'observava una disminució del nombre de fumadors, el nombre de dones que fumaven havia augmentat regularment fins al 1990, i s'havia estabilitzat en l'últim quadrienni. Malgrat tot al 1994, la prevalença del tabaquisme era encara superior en el sexe masculí que en el femení. En una enquesta realitzada l'any 1998 es va produir un increment en la prevalença global de la població.

Estadístiques realitzades entre gener i desembre de 1999 indiquen que un 54% dels fumadors són homes i un 46% dones (Pardell, 1999; Generalitat de Catalunya).

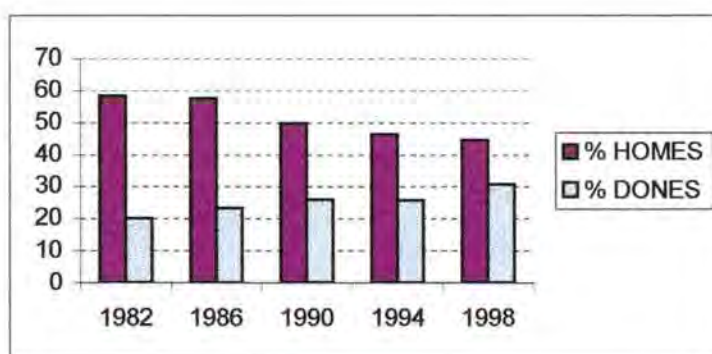


Fig. 3.1. Prevalença de l'hàbit tabàquic a la població general de Catalunya.

Taula 3.1. Distribució dels fumadors per edats (Generalitat de Catalunya).

EDAT(anys)	% (respecte al total de fumadors)
<15	0,13
15-19	0,65
20-29	9,0
30-39	30,3
40-49	32,7
50-59	19,0
>60	8,2



Les polítiques i programes globals de control del tabaquisme dirigides tant a la prevenció com a la cessació tabàquica poden ajudar a disminuir el creixement de l'epidèmia del tabaquisme. Les característiques comuns en programes de deshabitució que han tingut èxit han estat: recolzament social, resolució de problemes, ensenyar habilitats, educació d'estils de vida saludables i teràpia substitutiva amb nicotina o una altre teràpia farmacològica (Henningfield & Benowitz, 1995). El problema no és només deixar de fumar sinó mantenir l'abstinència.

## 3.2. LEGISLACIÓ

Pel que fa als continguts de nicotina, quitrà i monòxid de carboni en la **Directiva 2001/37/CE** s'estableix que:

- A partir de gener de 2004, el contingut màxim de nicotina, quitrà i monòxid de carboni en un cigarret despatxat, comercialitzat o fabricat a la Unió Europea no podrà ser superior a: 10mg de quitrà, 1mg de nicotina i 10mg de monòxid de carboni.
- Els continguts de quitrà, nicotina i monòxid de carboni seran mesurats segons les normes ISO 4387, 10315 i 8454 respectivament.

També dóna directrius sobre l'etiquetat, la informació que ha de portar cada paquet, advertències i contingut de quitrà, nicotina i monòxid de carboni.

Pel que fa a la publicitat la **Directiva 98/43/CE** prohibeix la publicitat en premsa i el patrocini d'esdeveniments esportius per part de les companyies tabacaleres, la data límit és l'1 d'octubre de 2006, a partir d'aquesta data només es podrà fer publicitat en els estancs.

## 3.3. COMPOSICIÓ QUÍMICA

El que es posa en contacte amb el fumador no és el tabac sinó el fum aspirat, per tant es parlarà de la composició del fum del tabac.

Durant la combustió que es produeix en la calada, es forma una atmosfera pobre en oxigen i rica en nitrogen on tenen lloc una gran varietat de processos químics i físics, que tenen com a resultat la formació de la majoria de components del fum.

En un cigarret d'1 g i de 70-80 mm de longitud es produeix 0.5 g de fum, on hi ha aproximadament de 4.000-6.000 compostos identificats (susceptibles d'augmentar a mida que es vagi estudiant). Entre aquests compostos trobem productes procedents del tabac, dels insecticides i altres productes del conreu de la planta, del paper del cigarret, dels additius del procés de curat del tabac i del tractament químic de la planta (Generalitat de Catalunya, 1982; IARC, 1986).

La composició del fum del tabac depèn no només del tipus de tabac sinó de múltiples factors com: profunditat de la inhalació, temperatura de combustió, longitud del cigarret, porositat del paper i la presència d'additius o filtres (IARC, 1986)

### **3.3.1. COMPOSICIÓ DEL FUM DEL TABAC**

El fum del tabac està format per dues fases en les que es reparteixen els seus components: fase gas i aerosol sòlid.

#### **3.3.1.1. PRINCIPALS COMPONENTS DEL FUM DEL TABAC (IARC, 1986)**

1. Òxids de carboni: CO, CO<sub>2</sub>
2. Òxids de nitrogen: NO, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, que poden ser els precursors de les N-nitrosamines en el corrent principal.
3. Amoni i amines volàtils.
4. Àcid cianhídric.
5. Aldehids i cetones volàtils: formaldehid, acetaldehid, propionaldehid, acroleïna, furfural.
6. Altres components volàtils: benzè, toluè (és l'hidrocarbur aromàtic volàtil més abundant present en el fum del tabac), hidrazina, uretà, 2-nitropropà, acrilonitril.
7. Alcans i alquens no volàtils: ciclopentà, ciclohexà i biciclohexil.
8. Isoprenoids: solanesol.
9. Fitosterols: colesterol, sitosterol, campesterol, stigmasterol.
10. Hidrocarburs aromàtics policíclics (HPA)
11. Aza-arenes.
12. Hidrocarburs O-heterocíclics: benzo[b] furà.
13. Alcohols: metanol, etanol, 2-propanol, 2-butanol.

14. Aldehids i cetones no volàtils: benzaldehid, 4-anisaldehyd, glicolaldehid.
15. Compostos fenòlics i quinones.
16. Àcids carboxílics: àcid fòrmic, àcid acètic.
17. Ésters d'àcids grassos amb fitosterol, solanesol i glicerol.
18. Lactones:  $\gamma$ -butirolactones.
19. Amines i amides: metilamina, pirrolidina, trimetilamina, anilina, naftalina, formamida, propionamida.
20. Alcaloides del tabac: nicotina, formilnicotina,
21. Piridines, pirrols i pirazines: piridina, picolina, lutidina, 2,3-dimetilpirazina.
22. N-nitrosamines: N'-nitrosornicotina, N'-nitrosoanatabina, N'-nitrosoanabasina.
23. Constituents inorgànics: la planta del tabac a l'igual que la resta de plantes conté minerals i constituents inorgànics que deriven del sòl: Alumini (Al) Cadmi (Cd), Coure (Cu); Plom (Pb), Mercuri (Hg) Níquel(Ni), Crom (Cr) i Arsènic (As).
24. Radioelements: radi-226, radi-228, tori-228,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{210}\text{Po}$  (emissor de partícules  $\alpha$ ), i també  $^{40}\text{K}$  (emissor de partícules  $\beta$ ).
25. Insecticides, herbicides, pesticides com el DDT, DDE, DDD o Malation.
26. Additius: humectants com el propilenglicol i el glicerol, trietilenglicol, sorbitol, aromatitzants com la cumarina o l'arrel de *Glycyrrhiza glabra*.

### 3.3.2. CORRENT PRINCIPAL I CORRENT SECUNDARI

Podem diferenciar com a mínim dues classes de fum del tabac:

1. Corrent principal (Mainstream smoke (MS))
2. Corrent secundari (Sidestream smoke (SD) o Environmental tobacco smoke (ETS)): corrent originat per la simple combustió del cigarret, sense que el fumador faci cap aspiració o pipada.

El corrent principal es genera en una atmosfera pobre en oxigen a una temperatura de 850-950°C, i el corrent secundari té lloc a temperatures més baixes i en una atmosfera reductora. Qualitativament el corrent principal i secundari són bastant semblants, però quantitativament presenten algunes diferències (Generalitat de Catalunya, 1982).

Taula 3.2. Composició aproximada per cigarret (sense filtre) d'alguns components del fum del tabac presents en el corrent principal i en el secundari (IARC, 1986).

COMPONENT	CORRENT SECUNDARI	CORRENT PRINCIPAL
QUITRÀ	24.1mg	11.4mg
CO	53.0mg	10-23mg
NICOTINA	4.1mg	1-2.3mg
ÒXID NÍTRIC	2-3mg	0.1-0.6mg
FENOL	10-400µg	60-140µg
BENZÈ	200-500µg	20-50µg
BENZO[a]PIRÈ	0.2µg	0.04µg
QUINOLINA	18µg	1.7µg
2-NAFTALINA	0.006µg	0.002µg
FORMALDEHID	7-3500µg	70-100µg
NITROSORNICOTINA	0.15-1.7µg	0.2-3µg
ÀCID CIANHÍDRIC	107.5µg	400-500µg
METÀ	4.03mg	1.3mg
DIÒXID DE CARBONI	324mg	20-60mg
ANILINA	11µg	360ng
Po-210	0.004Bq	0.003Bq

El pH del fum del tabac influeix en la proporció de nicotina i d'altres components bàsics en la fase vapor així com en la inhalabilitat del corrent principal (el pH del corrent principal varia entre 5,8-6,1 i el del corrent secundari entre 6,9-8). El fum del corrent principal de la majoria dels cigarrets és lleugerament àcid i menys irritant que el de la pipa, que pot ser àcid o alcalí o que el del cigar que és alcalí. El fum del cigarret és més fàcil d'inhalat ja que és menys irritant.

## 3.4. EFECTES TÒXICS DEL TABAC

Els principals responsables de la toxicitat del tabac són: la nicotina, el monòxid de carboni, els irritants i els carcinògens (Generalitat de Catalunya, 1982).

### 3.4.1. NICOTINA

La nicotina és la principal responsable de la dependència del tabac, és una de les drogues més addictives que es coneixen. Se sintetitza en les arrels de la planta (gènere *Nicotiana*) i es diposita en les fulles. La quantitat de nicotina continguda en un cigarret varia en relació al tipus de fulla, tècniques de plantació i mètodes d'industrialització com a factors més importants. Representa aproximadament el 7-8% del condensat total (Generalitat de Catalunya, 1982).

Els paquets de cigarrets contenen una mitjana de 0,4 mg a 1,6 mg de nicotina per cigarret. Està mesurada en unes condicions estandarditzades simulant amb una màquina l'acte de fumar, i no representa necessàriament la veritable quantitat de nicotina que arriba pel corrent principal al fumador.

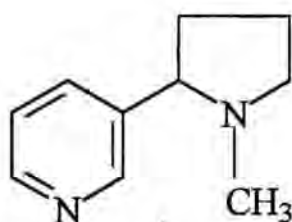


Fig. 3.2. Nicotina

És un alcaloide líquid de caràcter bàsic, picant i càustic, que actua sobre els receptors colinèrgics nicotínics, comportant-se com estimulants i bloquejant ganglionar. Es troba en el tabac en forma de sal i s'allibera per acció del calor en forma de base lliure. En el moment de la combustió se'n destrueix una quantitat important el 20-30%, un 30% s'allibera a l'atmosfera, el 45% passa a través del cigarret pel corrent principal i només arriba a la boca del fumador un 10-20% del total (Generalitat de Catalunya, 1982).



### 3.4.1.1. TOXICOCINÈTICA

**Absorció:** la seva absorció depèn del pH de la formulació (la forma no ionitzada travessa fàcilment les membranes biològiques): en els cigars i pipes, la nicotina es troba en forma de sals bàsiques, que es solubilitzen en la saliva, de manera que s'absorbeix la nicotina en l'epiteli de la cavitat orofaríngea, i no cal la inhalació del fum; en canvi en els cigarrets el fum és més àcid (la nicotina es troba en forma de sals àcides) i cal que aquest sigui inhalat per a l'absorció de la nicotina en la mucosa bronquial. També depèn la seva absorció del temps de contacte del fum amb les mucoses, de la profunditat de la inhalació, de la quantitat de nicotina present en el fum del tabac, del pH del líquid corporal que entra en contacte amb el fum, de l'aglomeració de partícules del fum i de l'ús de filtres. L'absorció pulmonar és molt ràpida degut a la major superfície de contacte. Els fumadors de cigarrets que inhalen el fum poden arribar a absorbir el 90% de la nicotina, però els que no inhalen el fum només absorbeixen un 10%. Quan el tabac es mastega, l'absorció de la nicotina és escassa.

**Distribució i metabolisme:** la nicotina un cop absorbida, difon ràpidament per tot l'organisme i travessa la barrera hematoencefàlica, també pot travessar la barrera placentària; les zones de major captació de nicotina són el cervell, la hipòfisi, i les glàndules suprarenals, la seva distribució està relacionada amb el contingut lipídic i no pas amb el flux sanguini. Pel metabolisme es destrueix un 80-90% de nicotina, aquest metabolisme té lloc en part al pulmó, ronyó i cervell i en un 90% al fetge (als microsomes hepàtics). Presenta una semivida de 1-2 hores. Per l'isoenzim polimòrfic CYP2A6 del citocrom P450 es metabolitza a cotinina, metabòlit principal i inactiu, la qual té una semivida de 16-20 hores i s'elimina per l'orina, s'utilitza com a marcador d'exposició tant directe com indirecte. Altres metabòlits són: desmetilcotinina, 3-hidroxicotinina, nicotina-1-N-òxid, gamma-(3-piridil)-gamma-oxo-N-metilbutiramina (Flórez, 1992; Gisbert, 1998).

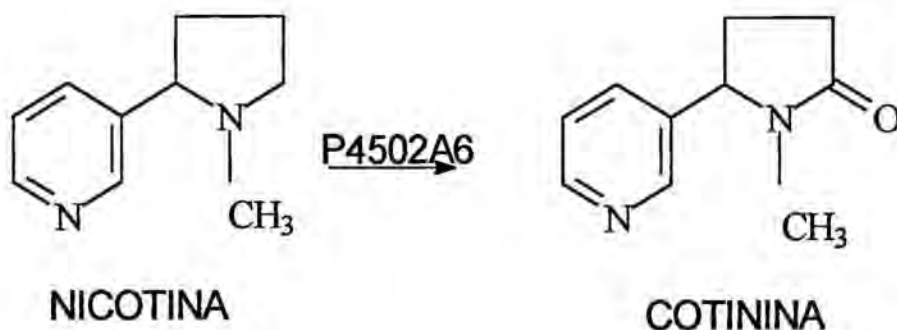


Fig. 3.3. Oxidació de nicotina a cotinina

**Eliminació:** l'eliminació majoritària dels metabòlits és per l'orina però una part s'elimina per la suor i la llet materna.

### 3.4.1.2. TOXICODINÀMIA

Produeix una estimulació inicial generalitzada dels ganglis vegetatius a través dels receptors nicotínics, que condueix a una complexa resposta com a resultat d'una combinació d'accions simpàtiques i parasimpàtiques, donant lloc a:

1. Efectes cardiovasculars com l'augment de pressió arterial, increment de la contractilitat cardíaca, del flux coronari i del consum miocàrdic d'oxigen. Provoca vasoconstricció perifèrica.
2. Efectes sobre el tracte digestiu com l'augment del peristaltisme gastrointestinal.
3. Augment de la secreció salival i bronquial.
4. Acció sobre el SNC que produeix nàusees, vòmits, tremolors i estimulació de la respiració, augment de l'atenció, facilita la memòria i disminueix la irritabilitat.
5. Increment de la concentració plasmàtica de glucosa, cortisol, vasopresina i àcids grassos lliures

A dosis elevades es produeix una inhibició de la transmissió ganglionar com a conseqüència d'una despolarització persistent dels ganglis (Flórez, 1992; Gisbert, 1998).

La dosi mortal en l'home de nicotina pura és de 1 mg/Kg de pes (Alfonso & Ibáñez, 1983).

### **3.4.2. MONÒXID DE CARBONI**

El monòxid de carboni (CO) és un gas no irritant, inodor, incolor i insípid, que es produeix en totes les combustions incompletes. S'absorbeix per via respiratòria, a través del pulmó té una difusibilitat superior al CO<sub>2</sub> i a l'O<sub>2</sub>. Com a conseqüència del catabolisme de l'hemoglobina es produeix CO endogen, pel que en condicions normals tenim un 0.4-0.7% d'hemoglobina saturada per CO. Aquest valor pot augmentar-se fins a un 2% si el medi que ens envolta és urbà i fins un 6% si la persona és fumadora (Marruecos et al., 1993; Gisbert, 1998).

#### **3.4.2.1. ACCIÓ**

S'uneix a la hemoglobina desplaçant així a l'oxigen unit a ella ja que el CO presenta una afinitat 240 vegades superior per la hemoglobina que l'oxigen i per tant disminueix la concentració d'oxihemoglobina en sang. En els teixits els enzims que contenen grup hemo (mioglobina, citocrom P450 i la citocrom-c-oxidasa) també tenen una elevada afinitat pel CO, en unir-se a la mioglobina disminueix el transport d'oxigen al múscul cardíac i esquelètic, produint-se una hipòxia tissular. Aquesta hipoxèmia agreuja la insuficiència coronària del malalt coronari i incrementa la permeabilitat als lípids, la qual cosa afavoreix la formació de plaques d'ateroma. El CO exerceix un efecte inotròpic negatiu i augmenta l'adhesivitat i l'agregabilitat de les plaquetes. Els efectes que exerceix sobre el SNC són dosi dependents. L'acció del CO a nivell del SNC, sobreposada a la de la nicotina, és la causa de trastorns de la percepció i de l'agilitat mental (Marruecos et al., 1993; Gisbert, 1998).

### **3.4.3. SUBSTÀNCIES IRRITANTS**

Substàncies com els aldehyds, els fenols, el quitrà, l'acroleïna, l'acetaldehid i l'amoníac tenen una acció irritant sobre l'arbre bronquial, al que s'ha d'afegir la paralització dels cilis de la mucosa donant lloc a una disminució dels mecanismes fisiològics de defensa.

El formaldehid és un tòxic que causa irritació ocular, nasal i faríngia.



### 3.4.4. SUBSTÀNCIES CANCERÍGENES I CO-CANCERÍGENES

Les substàncies millor estudiades són els hidrocarburs aromàtics policíclics (HPA), el formaldehid-acetaldehid, les nitrosamines, els elements radioactius, l'arsènic, els additius i contaminants. Aquestes substàncies determinen l'aparició d'alteracions histològiques de caràcter metaplàsic, provocant càncer de les vies aèries i digestives. No hi ha una sola substància responsable de l'efecte carcinogen sinó que són diverses les que actuen sinèrgicament mitjançant diversos mecanismes fisiopatològics: acció directa carcinògena sobre la cèl·lula, alteració de mecanismes enzimàtics i depressió de la immunitat.

## 3.5. PATOLOGIA TÒXICA PER TABAC

En iniciar-se a l'hàbit tabàquic es dóna una simptomatologia de tipus vegetatiu, que es produeix per l'efecte de la nicotina i del CO. Consisteix en: nàusees, vòmits, sudoració profusa i freda, visió borrosa, vertigen i marejos.

La major part de la patologia crònica derivada del consum del tabac es deu al monòxid de carboni, a la nicotina, als productes irritants i a compostos presents en el quitrà com els hidrocarburs policíclics aromàtics (HPA) (Generalitat de Catalunya, 1982; IARC, 1986; Gestal, 1988; Barrallo, 1998; Vaqué et al., 2001).

### 3.5.1. MALALTIES RESPIRATÒRIES

**Malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC):** aquest terme engloba la bronquitis crònica i l'emfisema pulmonar. Al principi, el dany causat pel fum és major en les vies aèries superiors on es produeix contracció de la musculatura llisa bronquial, bronquitis, augment del nombre de cèl·lules calciformes secretores de moc i disminució les cèl·lules ciliades que contribueixen de manera important a l'escombrat de la secreció bronquial cap a l'exterior de la secreció de moc, alteració de les característiques del moc i destrucció i paràlisi del cilis. Més tard, debilitats els mecanismes defensius s'afecta la membrana de l'alvèol capil·lar encarregada de la difusió dels gasos i es produeix l'emfisema que causarà la destrucció de la paret

alveolar. Els fumadors tenen una mitjana de 10 vegades més risc de morir per MPOC que els no fumadors.

**Càncer de pulmó:** el cigarret és el responsable de la gran majoria de càncers de pulmó. Es tractarà aquest aspecte posteriorment.

### 3.5.2. MALALTIES CARDIOVASCULARS

**Arteriosclerosi:** l'acció conjunta de la nicotina i el CO pel que fa a l'agregabilitat plaquetària i a la composició de lípids afavoreixen el procés aterogènic.

**Cardiopatia coronària:** el risc de malaltia coronària està relacionat directament amb la quantitat de tabac consumit i el temps de persistència de l'hàbit. La majoria dels autors situen aquest increment del risc en unes 2-2.5 vegades en relació amb els no fumadors de la mateixa edat, també cal tenir en compte que els fumadors que inhalen el fum presenten més risc que els que no ho fan.

La força del factor tabac en l'aparició de la malaltia disminueix a mesura que augmenta l'edat, degut a la importància creixent d'altres factors de risc.

En abandonar l'hàbit tabàquic el risc coronari disminueix i ho fa de manera relacionada al temps que fa que s'ha deixat de fumar.

**Mort sobtada:** de totes les morts per cardiopatia coronària un 50-60% aproximadament tenen lloc en forma de mort sobtada. La mort sobtada s'associa molt directament a l'hàbit de fumar sobretot en homes joves. Existeix una disminució de l'aparició de mort sobtada quan es deixa de fumar.

**Hipertensió arterial:** la nicotina per la seva acció adrenèrgica augmenta el pols i la pressió arterial, també augmenta els nivells d'hormona corticotropa i altera el sistema de regulació de la pressió arterial renina-angiotensina-aldosterona.

**Malaltia arterial perifèrica:** existeix una associació intensa amb el consum de tabac, s'ha trobat un increment del risc de 9 vegades per fumadors de més de 15 cigarrets al dia i un augment de 6 pels que fumen menys de 15. Existeix regressió del risc en aquells fumadors que deixen de fumar.

### 3.5.3. MALALTIES DE L'APARELL DIGESTIU

A nivell de la boca fumar embruta i enfosqueix les dents, produeix halitosi, gingivitis, piorrea i lesions leucoplàsiques prèvies al càncer de boca.

A nivell de l'esòfag facilita el reflux gastroesofàgic donant lloc a esofagitis. El càncer d'esòfag té una relació directa amb l'hàbit de fumar, la ingestió d'aliments massa calents i el consum d'alcohol.

Pel que fa a l'estómac i intestí el fum del tabac augmenta la prevalença d'úlcer gastro-duodenal, retarda la seva cicatrització i incrementa les seves complicacions. Per una altra banda la nicotina pel seu efecte parasimpàtic és útil per evitar l'estrenyiment atònic.

### 3.5.4. ALTRES MALALTIES

El tabac origina faringitis crònica, obstrucció nasal, alteracions de l'olfactació, sinusitis, laringitis crònica, queratosi laríngia i s'associa al càncer de laringe, de bufeta, de ronyó i de pàncreas. També origina ambliopia tabàquica, ocasionada per dèficit de factors vitamínics B secundaris al consum de tabac. Pot provocar rinitis al·lèrgica i asma en comportar-se com a al·lergen. El fum del tabac origina conjuntivitis.

## 3.6. CÀNCER EN FUMADORS

Els llibres *Cautions against the immoderate use of snuff* publicat pel Dr. John Hill (1716?-1775) i *Chirurgical observations* publicat pel Dr. Percivall Pott el 1775, són les primeres referències sobre l'efecte carcinogen del tabac.

L'any 1914 es va demostrar científicament l'efecte carcinogen dels hidrocarburs continguts en el fum del tabac per Yamagawa i Ichikawa, i va ser l'any 1933 quan Cook i col·laboradors van aïllar el 3,4-benzopirè del fum del tabac

Els primers estudis cas-control (retrospectius) i de cohorts (prospectius), que comparaven el risc de càncer en fumadors i en no-fumadors, van ser publicats a principis dels anys 50 i conclouien que existeix una associació real entre el carcinoma de pulmó i l'hàbit tabàquic. Entre aquests treballs destaca el publicat per Richard Doll el 1950 (Doll & Hill, 1950; Estapé et al., 1987).

Actualment està totalment demostrat l'important paper que juga el tabac en determinats tipus de càncers.

### 3.6.1. EL FUM DEL TABAC COM A MESCLA CARCINOGENICA

Podem distingir dos tipus d'agents carcinògens presents en el fum del tabac en funció del nivell d'actuació en el procés cancerigen:

1. Substàncies que actuen a nivell genètic, transformant la cèl·lula normal en tumoral com els HPA.
2. Substàncies que estimulen les cèl·lules ja prèviament alterades: fenols, ésters d'àcids grassos i àcids grassos lliures i nicotina. La nicotina estimula l'angiogènesi i el creixement tumoral (Heeschen et al., 2001).

#### 3.6.1.1. SUBSTÀNCIES CARCINOGENIQUES PRESENTS EN EL FUM DEL TABAC (IARC, 1986)

- El **benzè** és un carcinogen humà (IARC, 1982a) que es troba al corrent principal i secundari. Es forma durant la combustió del tabac a partir de precursors que tinguin un anell aromàtic o ciclohexà, i també per pirosíntesi a partir de radicals com el  $C_6H_5\cdot$ .
- La **hidrazina** és un carcinogen en rata i ratolí (IARC, 1974a).
- L'**uretà** (etil carbamat), carcinogen en ratolí, rata i hámster (IARC, 1974b).
- **2-Nitropropà**, carcinogen en rates (IARC, 1982c),
- **Clorur de vinil** (IARC, 1982b), el seu nivell al corrent principal és directament proporcional a la quantitat de clorur que conté el tabac.
- **Metalls**: l'arsènic i els seus compostos i el crom i els seus compostos són associats de manera causal amb el càncer humà. El níquel i el cadmi i els seus compostos són probablement carcinògens pels humans. Els compostos de cobalt han resultat ser carcinògens en animals de laboratori.
- **Acrilonitril** (IARC, 1982b), és carcinogen en rates i probablement en humans.
- **Formaldehid** (IARC, 1982a), **acetaldehid** (IARC, 1985b), **acroleïna** (IARC, 1985c). El formaldehid indueix carcinoma nasal en rates.
- **Hidrocarburs policíclics aromàtics (HPA)**: antracè, benzo[a]pirè, fluorantè, fluorè, fenantrè. El con de combustió del tabac (850-950°C) presenta una atmosfera reductora ( $N_2$  53%,  $CO_2$  18%,  $CO$  12%,  $H_2$  8%,  $O_2$  1.4%) en la qual



CH-radicals primaris es formen per pirolisi de la matèria orgànica. Aquests radicals inestables són els precursors de la pirosíntesi dels compostos aromàtics policíclics, i en especial del hidrocarburs policíclics aromàtics.

- **N-Nitrosamines:** mentre es fuma el tabac tres classes de N-nitrosamines es van formant:
  1. N-nitrosamines volàtils: N-nitrosopirrolidona N-nitrosodimetilamina. Formades principalment a partir d'amines i òxids de nitrogen presents en el fum del tabac. La fracció proteica del tabac és el seu precursor major. Totes elles van ser classificades per la IARC com a carcinògenes.
  2. Nitrosamines no volàtils: els cigarrets, els cigars i les pipes contenen àcids nitrosamínics no volàtils que es poden descarboxilar durant la combustió i donar lloc a les nitrosamines carcinògenes.
  3. N-nitrosamines específiques del tabac: N'-nitrosornicotina (NNN), N'-nitrosoanatabina (NAT), N'-nitrosoanabasina (NAB). Apareixen durant els processos de curat i de consum del tabac, per N-nitrosació de la nicotina i en menor grau d'alcaloides piridínics. Se sospita del seu elevat poder carcinogènic.

## 3.6.2. TIPUS DE CÀNCERS ASSOCIATS AL TABAC

### 3.6.2.1. CÀNCER DE PULMÓ

El primer diagnòstic de càncer primari de pulmó, reconegut per la majoria dels investigadors, va tenir lloc al 1810 pel Dr. Bayle, malgrat que els primers casos probables de pulmó van ser descrits per Morgagni el 1761 (Gestal, 1988).

La mortalitat per càncer de pulmó ha augmentat de forma important en tots els països del món després de la Segona Guerra Mundial. Aquest augment es va produir uns 25 anys després que el consum de cigarrets passés a ser un hàbit corrent entre la població.

#### Tipus de càncer de pulmó

L'organització Mundial de la Salut (OMS) va agrupar al 1977 els diferents tipus de càncer de pulmó en **NSCLC** (Non-small-cell lung cancer) que comprenia:

adenocarcinoma, càncer de cèl·lules escatoses i càncer de cèl·lules grans; i **SCLC** (small-cell lung cancer) càncer de cèl·lules petites. El tipus NSCLC representa un 80% del total de càncers de pulmó, mentre que SCLC representa en 20% restant.

### **Relació amb el tabac**

El càncer de pulmó rarament apareix en absència d'exposició ambiental, aproximadament el 95% del risc atribuïble es degut al consum de tabac (IARC, 1986; Sellers, 1996).

Els càncers que s'associen al consum de tabac són: càncer de cèl·lules escatoses, l'adenocarcinoma i sobretot el càncer de cèl·lules petites (Macdonald & Ford, 1997).

Per estudis realitzats s'ha observat que el risc de desenvolupar càncer de pulmó està relacionat amb (Gestal, 1988):

1. **El nombre de cigarrets consumits:** el risc relatiu s'incrementa en augmentar el nombre de cigarrets fumats al dia.
2. **L'edat d'inici de l'hàbit:** les persones que ha iniciat l'hàbit tabàquic durant l'adolescència i continuen fumant en l'edat adulta tenen un risc elevat.
3. **Les formes de fumar** que augmenten l'exposició del pulmó als contaminants de fum del tabac, els que fumen cigarrets tenen risc més elevat que els que fumen cigars o pipes.
4. **Ús de filtres:** el risc de càncer de pulmó a llarg termini (superior o igual a 20 anys) dels fumadors amb filtre és menor comparat amb els altres fumadors.
5. **Concentració de nicotina i quitrà dels cigarrets:** s'ha fet l'observació que el consum de cigarrets amb quantitats baixes o mitjanes de nicotina i quitrà disminueixen el risc de patir càncer de pulmó pels fumadors.
6. **Tipus de tabac:** existeix un risc més elevat de càncer de pulmó en els fumadors de tabac negre que en els fumadors de tabac ros (Benhamou & Benhamou, 1993).

Cal destacar que a tots els estudis epidemiològics prospectius, els fumadors que van abandonar llur hàbit experimentaren una important reducció del seu risc de patir càncer de pulmó en relació amb els que continuaren fumant, de tal manera que als

10-15 anys de deixar de fumar el risc és gairebé tant baix com els individus que mai no han fumat.

L'any 1998 a Espanya es van morir 15.406 homes de càncer de pulmó amb una mitjana d'edat de 68 anys i 1.768 dones amb una mitjana d'edat de 68 anys (Servicio de Epidemiología del Cáncer).

### **Predisposició familiar al càncer de pulmó**

El càncer de pulmó es creu que és el resultat de la interacció gen-medi ambient, de manera que en absència d'exposició ambiental (fum del tabac) la susceptibilitat heretada és menor i no s'expressa. Es postula la hipòtesi que la predisposició genètica al càncer de pulmó existeix i s'hereta, però només és manifesta quan es posa en contacte amb el fum del tabac (Sellers, 1996).

### **Genètica del càncer de pulmó**

En les cèl·lules tumorals tenen lloc algunes anormalitats citogenètiques típiques (Macdonald & Ford, 1997; Weintraub, 1998):

- Delecció en el braç curt del cromosoma 3 (3p14-p23) es creu que aquesta pèrdua d'informació genètica precedeix al dany en el gen de la p53. El gen FHIT s'ha mapat en aquesta zona i es considera com un possible candidat a gen supressor del tumors.
- Mutacions en els oncogens Ras i Myc:
  - Sobreexpressió dels 3 membres de la família Myc (NMyC, LMyC i Myc).
  - Mutacions en els membres de la família Ras particularment en el codó 12 de KRas. Augment de l'expressió del gen Ras i anormalitats estructurals del gen.
- En el càncer de pulmó predominen les transversions G → T en el gen de la p53.
- Les cèl·lules dels tumors pulmonars tenen desregulada l'expressió de la telomerasa, enzim relacionat amb la "immortalitat" de les cèl·lules tumorals (Sancho et al., 2000).
- **NSCLC**: es característic d'aquest tipus les deleccions i translocacions en la regió cromosòmica 9p21(és el canvi més freqüent). Un 20-30% dels NSCLC presenten mutacions en el gen Rb, i un 60% tenen mutada la p53. L'oncogen



HER2/NEU (també anomenat ERBB2) codifica per a una proteïna transmembrana p185<sup>neu</sup> la qual té molta homologia amb el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR). Elevats nivells d'EGFR han estat associats a NSCLC (Weintraub, 1998).

- **SCLC:** es característic d'aquest tipus les mutacions en ras, APC i membres de la família myc. El 90% dels SCLC presenten mutacions en el gen Rb. Els pacients amb retinoblastoma que presenten mutacions germinals en el gen Rb tenen un risc marcadament elevat de patir SCLC. La p53 en el tipus SCLC es troba mutat en un 90% del casos (Weintraub, 1998).

### 3.6.2.2. CÀNCER DE LARINGE

Els fumadors presenten un risc de desenvolupar càncer de laringe de 9 a 13 vegades més gran que els no-fumadors.

Juguen un paper important:

- El nombre de cigarrets fumats
- Si es fuma amb filtre o no
- El consum d'alcohol, que té un efecte sinèrgic amb l'hàbit tabàquic.
- El tipus de tabac fumat: el risc és major pels fumadors de tabac negre que pels que fumen tabac ros (Sancho-Garnier & Theobald, 1993).

L'any 1998 la mortalitat a Espanya per càncer de laringe va ser de 1.695 homes amb una mitjana d'edat de 65 i de 53 dones amb una mitjana d'edat de 67 anys (Servicio de Epidemiología del Cáncer).

### 3.6.2.3. ALTRES CÀNCERS

**Càncer de boca i leucoplàsia:** el tabac té un paper decisiu, sent el risc relatiu de 3 a 10 vegades més gran que en els no-fumadors. El consum d'alcohol té un efecte multiplicatiu com a factor de risc (Jonhson, 2001).

**Càncer d'esòfag:** el risc relatiu del fumadors és de 1.35-11.1 segons els estudis i el tipus de tabac consumit i s'ha trobat una relació positiva amb el consum d'etanol.

**Càncer de bufeta de l'orina:** també relacionat amb el consum de tabac, existeix relació entre el risc i la durada de l'hàbit. Un altre factor de risc per aquesta malaltia

són ocupacions que exposin al treballador a amines aromàtiques. El fet de fumar pipes o cigars comporta risc menor que el de fumar cigarrets (Pitard et al., 2001).

**Càncer de ronyó:** el seu risc és proporcional al nombre de cigarrets consumits.

**Càncer de pàncreas:** risc relatiu de 5 en els fumadors en comparació amb els no-fumadors.

### 3.7. EL TABAC DURANT LA GESTACIÓ

El pes del nadó fill de mare fumadora és en molts casos inferior al de fills de mares que durant l'embaràs no van fumar. Aquesta relació és independent de totes les altres variables que també afecten al pes del nadó, com per exemple l'edat de la mare. Aquest pes inferior del nadó es degut a un retard directe de creixement intrauterí, que afecta a més del pes a totes les dimensions del fetus. Existeix la hipòtesi que la hipòxia fetal relativa que es produeix en els embarassos de dones fumadores és la causa del retard creixement fetal.

Estudis han demostrat també l'existència d'una relació entre el consum de tabac durant l'embaràs i el risc d'avortament espontani, embarassos ectòpics i mortalitat perinatal.

El consum de tabac per les dones s'ha demostrat que redueix el seu període fèrtil, ja que rebaixa l'edat de la menopausa espontània, també redueix la fertilitat de la dona (Gisbert, 1998; Vaqué et al., 2001).

### 3.8. EL FUMADOR PASSIU

El fumador passiu és aquella persona que està exposada al fum del corrent secundari dels cigarrets, la composició qualitativa del qual és semblant al del corrent principal, però quantitativament conté més CO, quitrà, amoníac, nicotina i benzo[a]pirè que el corrent principal.

L'efecte del fum del tabac sobre el fumador passiu és un tema controvertit. En els primers estudis no quedava prou clara la relació entre l'exposició i el risc a desenvolupar determinades patologies, però estudis recents han esclarit més el tema.

En els fumadors passius s'ha trobat un increment del risc de càncer de pulmó, tenen alteracions dels fluxos espiratoris forçats mitjà i final, i pateixen les conseqüències hemodinàmiques provocades pel CO (Leonard & Sachs, 1999).

També s'ha associat a símptomes nasals aguts i crònics (Benninger, 1999), malalties del tracte respiratori i del sistema cardiovascular (Pitard et al., 2001).

En els nens de famílies fumadores s'ha observat un augment de les infeccions respiratòries.

La revista *The Lancet* va publicar que la companyia tabacalera Phillip Morris va pagar a investigadors per a que desacreditessin un informe fet per l'Agència Internacional d'Investigacions sobre el Càncer (IARC), que depèn de l'OMS, on es conclouia que les dones de marits fumadors i les persones que treballen envoltades de gent que fuma corren un risc més elevat de tenir càncer (Ong & Glantz, 2000).

## **4. POLIMORFISMES METABÒLICS I LA SEVA BASE GENÈTICA**

### **4.1. EL METABOLISME DELS TÒXICS**

Els organismes estan exposats a un gran nombre de compostos químics aliens, els xenobiòtics, que poden tenir funcions diferenciades dins del nostre organisme: funció beneficiosa (per exemple fàrmacs a dosi terapèutica), funció tòxica o bé cap funció. Aquests efectes estan condicionats per les seves propietats fisicoquímiques.

Per fer front a aquesta exposició, l'organisme ha desenvolupat uns sistemes de protecció cel·lular, de tots ells el que més destaca és el metabolisme o biotransformació. La majoria dels xenobiòtics quan entren al nostre organisme són transformats parcial o totalment en d'altres substàncies, els enzims encarregats de fer aquestes transformacions estan localitzats al fetge principalment, malgrat que també es troben en petites proporcions a pulmó, ronyó, intestí i d'altres teixits. Existeix una minoria de compostos que no són metabolitzats i s'excreten sense modificar (Flórez, 1992).

L'objectiu del metabolisme és facilitar l'eliminació dels tòxics (per exemple tòxics lipòfils), però en alguns casos la pot alentar (alguns tòxics volàtils). A vegades els tòxics no s'eliminen sinó que s'acumulen. El metabolisme canvia les propietats fisicoquímiques dels compostos, per tant si els efectes dels xenobiòtics dins de l'organisme estan condicionats per aquestes propietats, el metabolisme també variarà els seus efectes biològics. Malgrat que el resultat del metabolisme és sovint una inactivació, també pot tenir lloc una bioactivació.

El metabolisme de les substàncies xenobiòtiques esdevé principalment en dues etapes: el metabolisme de fase I i el de fase II.

- **El metabolisme de fase I** implica l'addició de nous grups funcionals a la molècula, en general grups electròfils, ja sigui per oxidació, reducció o bé hidròlisi. Aquests canvis augmenten en general la polaritat de la molècula i poden donar lloc a metabòlits inactius i/o a metabòlits actius (procés de bioactivació) (Flórez, 1992; Lang & Pelkonen, 1999).
- **El metabolisme de fase II** és de conjugació. Els xenobiòtics o els metabòlits resultants de la fase I s'uneixen a un substrat endogen com per exemple l'àcid glucurònic o el glutatió. Els productes resultants són en general més grans de tamany, més polars i més fàcilment eliminables per l'orina o per la bilis. El fet d'introduir un grup funcional a fase I facilita la reacció amb les molècules endògenes de la fase II (Flórez, 1992; Lang & Pelkonen, 1999).

Alguns xenobiòtics són metabolitzats per varis enzims i existeix un balanç entre els enzims que s'encarreguen de la seva desactivació i els enzims que donen lloc a metabòlits més reactius i més tòxics (Nebert & Weber, 1990; Gonzalez & Kimura, 1999).

Entre els sistemes de desactivació les glutatió-S-transferases (E.C. 2.5.1.18) i l'epòxid hidrolasa (E.C. 3.3.2.3) juguen un paper important pel que fa a la protecció de l'organisme contra els grups electròfils i els productes de l'estrès oxidatiu (Gonzalez & Kimura, 1999).



### **4.1.1. METABOLISME DE FASE I**

Inclou el sistema de les monooxigenases microsomals, oxidacions mitocondrials i citosòliques, reduccions i hidròlisis.

#### **4.1.1.1. SISTEMA DE LES MONOOXIGENASES MICROSOMALS**

Les monooxigenases dependents del citocrom P450 i les que contenen flavina catalitzen les reaccions de monooxigenació. Són enzims que es troben adossats a l'estructura membranosa del reticle endoplasmàtic llis.

La superfamília del citocrom P450 està formada per enzims amb grups hemo-tiolat, hemoproteïnes que al combinar-se amb el monòxid de carboni en el seu estat reduït formen un complex que absorbeix la llum a 450nm. Es troben àmpliament representades a la natura. En la seva major part són monooxigenases. Engloba al voltant de 500 proteïnes diferents classificades en 36 famílies i subfamílies en funció de la seva homologia en la seqüència dels aminoàcids. Tenen un paper important en el metabolisme carcinogènic els citocroms P450 que pertanyen a les famílies 1, 2 i 3. Les reaccions que poden catalitzar són molt diverses: hidroxilacions, desalquilacions, desaminacions, desulfuracions, formació de sulfòxids i epoxidacions.

L'expressió dels citocroms P450 es regula principalment per la transcripció de la proteïna, algunes formes s'expressen en l'individu de manera constitutiva, però d'altres ho fan en funció del sexe, o del teixit en el que es troben, també poden existir fenòmens d'inducció per part d'altres xenobiòtics.

La inducció del citocrom P450 pels hidrocarburs policíclics aromàtics té lloc a nivell de la transcripció de manera que la inducció esdevé per un augment de la síntesi de l'enzim i no pas per l'activació de proteïna ja existent. Està mitjançada pel receptor Ah (anomenat així perquè s'activa pels hidrocarburs aromàtics), que és un factor de transcripció citosòlic. Presenta polimorfisme genètic (Lewis, 1996; Lang & Pelkonen, 1999).

#### **4.1.1.2. HIDRÒLISIS**

Són catalitzades per hidrolases que es troben àmpliament distribuïdes pel plasma i els teixits. En funció de l'enllaç hidrolitzat es divideixen en: esterases, amidases, glucosidases i peptidases.

#### **4.1.2. METABOLISME DE FASE II**

Són reaccions majoritàriament de conjugació.

##### **4.1.2.1. GLUCURONITZACIÓ**

És la transferència enzimàtica de la molècula de l'àcid uridindifosfat glucurònic (UDPGA), que actua com a donador de l'àcid glucurònic, a diversos acceptors. Aquesta reacció està catalitzada per les UDP-glucuronil transferases (UDPGT).

##### **4.1.2.2. CONJUGACIÓ AMB GRUPS SULFAT**

Els enzims implicats són les sulfotransferases. Transfereixen un grup sulfat el qual requereix una activació prèvia.

##### **4.1.2.3. METILACIÓ**

Les metiltransferases catalitzen la reacció de metilació addicionant radicals metil. Es troben en molts teixits. El grup metil que es transfereix s'ha d'activar prèviament a S-adenosimetionina (SAM). Els grups principals de metiltransferases són: O-metiltransferases, N-metiltransferases, S-metiltransferases i C-metiltransferases.

##### **4.1.2.4. ACILACIONS**

És la incorporació d'un grup acil (o acetil, a vegades) als radicals amino o carboxil dels fàrmacs. La reacció està catalitzada per les aciltransferases i cal la participació de derivats del coenzim A.

Entre les aciltransferases destaca la N-acetiltransferasa (NAT), encarregada de l'acetilació d'amines aromàtiques o heterocícliques així com de les hidrazines. Es troba en molts teixits i presenta polimorfisme.

#### 4.1.2.5. CONJUGACIÓ AMB GLUTATIÓ

És la transferència del glutatió ( $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) a productes electròfils per donar lloc a conjugats inactius. El glutatió en forma reduïda o forma tiol (GSH) és un nucleòfil i intracel·lularment es troba com a tal. Els enzims implicats són les glutatió S-transferases que seran tractades més àmpliament en un capítol posterior.

#### 4.1.2.6. ALTRES CONJUGACIONS

Glucosidació (conjugació amb glucosa) i conjugació amb ribòsids i ribòsid-fosfat

### 4.2. POLIMORFISMES METABÒLICS

Nombrosos casos clínics han demostrat que les diferències individuals en la capacitat de metabolitzar als xenobiòtics (polimorfisme metabòlic) poden influir en la resposta dels pacients a la teràpia amb fàrmacs: poden conduir a un augment dels efectes tòxics dels mateixos o bé a disminuir el seus efectes terapèutics (Meyer & Zanger, 1997).

#### 4.2.1. N-ACETILTRANSFERASA

La variabilitat en l'acetilació fou observada per primera vegada amb la isoniazida en pacients amb tuberculosi. El 1953 es va descriure la variació interindividual en l'eliminació d'aquest fàrmac (Bönicke & Reif, 1953). Estudis familiars van posar de manifest que la variació estava en part controlada genèticament. A partir d'aquí es va veure que nombrosos xenobiòtics (tòxics o fàrmacs) estaven acetilats de manera polimòrfica: procaïnamida, dapsona, cafeïna i sulfapiridina entre d'altres. Els substrats de la N-acetiltransferasa són la major part amines aromàtiques i hidrazines, que en transferir el grup acetil es transformen en amides.

S'han identificat un pseudogen i dos gens funcionals NAT1 i NAT2. Els dos gens funcionals, localitzats al cromosoma 8, són polimòrfics i contribueixen al fenotip acetilador (Meyer & Zanger, 1997; Lang & Pélkonen, 1999).

La capacitat d'acetilar és la mateixa per un individu durant tota la seva vida, però varia d'un individu a un altre. La freqüència del fenotip lent presenta diferències en



funció de l'ètnia, així per exemple en població caucàsica existeix d'un 40 a un 70% d'acetiladors lents, mentre que les poblacions asiàtiques com la japonesa o xinesa tenen d'un 10 a un 30% (Nebert & Weber, 1990; Meyer & Zanger, 1997).

Existeix una relació entre aquest polimorfisme i la toxicitat de certs fàrmacs i tòxics, així com una possible relació de risc de desenvolupar alguns càncers com el de bufeta (Miller et al., 1997).

## **4.2.2. CITOCROM P450**

### **4.2.2.1. ISOENZIM P4501A1 (CYP1A1)**

És l'isoenzim principal que catalitza el primer pas del metabolisme dels HPA i els transforma en compostos electrofílics. La seva expressió està regulada transcripcionalment pel receptor citosòlic Ah (Lang & Pelkonen, 1999). Fins ara s'han descrit quatre polimorfismes en el gen CYP1A1 (algun d'ells, com el MspI s'ha relacionat amb un possible augment del risc de càncer de pulmó en fumadors) (Pavanello & Clonfero, 2000).

### **4.2.2.2. ISOENZIM P4502A6 (CYP2A6)**

Aquest isoenzim metabolitza entre d'altres substrats a la nicotina i dona lloc principalment a la cotinina, metabòlit inactiu. Presenta polimorfisme i s'ha relacionat amb la diferent capacitat addictiva de la nicotina en els individus. Els individus que presenten al·lel nul podrien tenir un risc menor d'esdevenir addictes a la nicotina. Aquest isoenzim també bioactiva les nitrosamines, presents en el fum del tabac, a compostos carcinògens, per tant en principi els al·lells nuls podrien disminuir aquesta activació. S'ha postulat que en presència d'al·lells nuls el risc de desenvolupar els càncers relacionats amb el tabac pot ser menor (Pianezza et al., 1998).

### **4.2.2.3. ISOENZIM P4502D6 (CYP2D6)**

A final dels anys 70 es va observar en un voluntari sa una resposta hipotensiva molt marcada a un fàrmac bloquejant adrenèrgic antihipertensiu: la debrisoquina

(Maghgoub et al., 1977), també es va descriure un augment dels efectes secundaris associats a l'esparteïna, un fàrmac antiarrítmic (Eichelbaum et al., 1979). Estudis familiars van revelar que les reaccions d'oxidació presents en el metabolisme d'aquests dos fàrmacs estaven sota control monogènic i que els que metabolitzaven poc eren homozigots per l'al·lel recessiu. El polimorfisme implicat era el de l'isoenzim CYP2D6 del citocrom P450.

Molts fàrmacs són metabolitzats per aquest isoenzim: antidepressius, barbitúrics, opiàcis, amfetamines, etc.

Determinats al·lells d'aquest polimorfisme podrien estar associats a un risc elevat de desenvolupar càncer (Meyer & Zanger, 1997).

Altres isoenzims del citocrom P450 també presenten polimorfisme genètic amb implicacions en la resposta individual als fàrmacs, així com altres enzims del metabolisme de fase I com l'epòxid hidrolasa microsomal o l'alcohol deshidrogenasa; i del metabolisme de fase II com les glutatió S-transferases. Els polimorfismes de l'epòxid hidrolasa microsomal i de les glutatió S-transferases es desenvoluparan més endavant.

### 4.3. POLIMORFISMES GENÈTICS

Alguns gens tenen una seqüència estàndard, l'al·lel normal, que es dona en la majoria de la població, i els al·lells que no tenen aquesta seqüència determinada són rars. N'hi ha d'altres gens en els que no existeix aquesta seqüència estàndard perquè existeix molta variació i no es pot designar a cap al·lel com a al·lel normal. En aquest segon cas es diu que existeix polimorfisme. Un polimorfisme genètic és un locus amb dos o més al·lells polimòrfics; i un al·lel és polimòrfic si la seva freqüència en la població és superior a l'1% (Lewin, 1997).

En l'ADN existeix una enorme variació a nivell de la seva seqüència entre diferents individus de la població, aproximadament 1 de cada 100-200 pb és polimòrfica. Per tant l'ADN de cada individu conté milions de diferències respecte a un altre individu a l'atzar (excepte bessons idèntics) (Beaudet et al., 2001).

Els polimorfismes poden ser-hi tant en regions codificants de l'ADN com en regions no codificants, i es poden classificar en tres categories (Beaudet et al., 2001):

1. Polimorfismes que NO tenen efecte fenotípic, com poden ser els polimorfismes utilitzats en la identificació forense.
2. Polimorfismes que SÍ tenen efecte fenotípic però sense afectar a la susceptibilitat a la malaltia. Determinarien diferències en el color dels cabells, dels ulls etc.
3. Polimorfismes que contribueixen al procés de malaltia. El seu paper pot ser des de modest fins a molt important.

### **4.3.1. TIPUS DE POLIMORFISMES GENÈTICS**

#### **4.3.1.1. FRAGMENTS DE RESTRICCIÓ DE TAMANY POLIMÒRFIC (RFLP)**

Quan es sotmet l'ADN a l'acció d'enzims de restricció aquests el tallen en diferents punts (dianes de restricció) i apareixen fragments d'ADN de longitud o tamany variable. El patró d'aquests fragments i el seu tamany és característic de cada individu, ja que entre la població pot existir variació en els llocs de tall. Els fragments tenen herència mendeliana.

Els RFLPs poden estar causats per:

1. Presència o absència d'un lloc específic de tall (diana) d'una endonucleasa de restricció. Generalment és un polimorfisme de còpia única.
2. Presència o absència de fragments extra d'ADN entre dues dianes de restricció degudes generalment a insercions o delecions de l'ADN (Gené et al., 1991).

#### **4.3.1.2. POLIMORFISME NUCLEOTÍDIC SENZILL (SNP)**

L'SNP (*single nucleotide polymorphisms*) és un polimorfisme on la variació té lloc en un sol nucleòtid, és un polimorfisme de seqüència. Cada individu és únic si es defineix pels seus SNPs (Lewin, 1997). Un cas dels SNPs són els RFLPs on la variació està localitzada en una diana de restricció.

Els SNPs es poden detectar mitjançant tècniques de reacció en cadena de la polimerasa (PCR) i posterior digestió amb enzims de restricció; o bé amb la tècnica

AS-PCR (allele specific PCR), on els oligonucleòtids de la PCR són específics per cadascun dels al·lels. La tècnica de PCR permet l'estudi de polimorfismes genètics a partir de quantitats mínimes de material biològic.

#### **4.3.1.3. MINISATÈL·LITS I MICROSATÈL·LITS**

L'ADN satèl·lit està format per diferents seqüències repetides en tàndem que no es transcriuen, ni es tradueixen. Aquest ADN es troba localitzat en tots els cromosomes (Lewin, 1997).

Els VNTR (*variable number of tandem repeats*) són polimorfismes de tamany la detecció dels quals es realitza per la tècnica de PCR, el fragment amplificat presenta tamany variable en funció del número de vegades que està repetida una unitat de repetició. Els podem dividir en minisatèl·lits i microsatèl·lits en funció del tamany d'aquesta unitat:

1. Minisatèl·lits: la unitat de repetició sol tenir tamany que oscil·len entre 10-70 pb.
2. Microsatèl·lits o STRs (*short tandem repeats*) unitats de repetició entre 2-6 pb.

#### **4.3.1.4. POLIMORFISME DE TAMANY I DE SEQÜÈNCIA**

Existeix una unitat de repetició però pot patir alguna mutació i entre unitats de repetició presentar seqüències diferents. Són una combinació de polimorfismes de tamany i de seqüència, s'anomenen minisatèl·lits d'unitat de repetició variant o MVR (Minisatellite Variant Repeat).

### **4.4. DELS POLIMORFISMES METABÒLICS ALS POLIMORFISMES GENÈTICS**

Les diferents formes d'una mateixa proteïna són conseqüència en part de múltiples variacions (al·lels) del gen que la codifica. Els enzims implicats en el metabolisme del xenobiòtics poden presentar diferents formes que poden donar lloc a diferents capacitats de metabolitzar els compostos (Lang & Pelkonen, 1999).

La resposta individual als xenobiòtics està modulada per diferents factors: l'edat, la dieta, les hormones, els factors ambientals, alteracions patològiques i per la predisposició genètica de l'individu (Nebert & Weber, 1990). Els polimorfismes



genètics dels enzims implicats en la biotransformació són en un nombre elevat de casos un dels majors factors involucrats en la varietat interindividual en el metabolisme del xenobiòtics (Wormhoudt et al., 1999).

Els gens dels enzims implicats en el metabolisme del xenobiòtics, en general són gens estructurals amb un nombre variable d'exons i d'introns, i seqüències reguladores a 5' i 3' de la regió codificant. La regulació d'aquests gens és complexa ja que està afectada per factors genètics i ambientals (Pelkonen et al., 1999).

Les alteracions a nivell genètic donen lloc a canvis en els enzims que es poden agrupar en:

1. Canvi en les propietats catalítiques dels enzims
2. Canvi en l'expressió de la proteïna: o bé no s'expressa o bé presenta diferents nivells d'expressió.

El polimorfismes genètics dels enzims metabòlics estan presents en les cèl·lules germinals, presenten herència mendeliana i tenen baixa penetrància. Generalment els seus efectes només es manifesten quan l'individu s'exposa a xenobiòtics que són substrat d'aquests enzims polimòrfics, si no els seus efectes romanen silencis (Nebert & Weber, 1990).

## 5. LES GLUTATIÓ S-TRANSFERASES

Les glutatió S-transferases (GST) (E.C.2.5.1.18.) són una família d'enzims, implicats en el metabolisme de fase II, que catalitzen reaccions de transferència del glutatió (GSH) a compostos amb un centre electròfil per formar conjugats; també actuen com a peroxidases i isomerases (Hayes & Pulford, 1995). Van ser identificades al 1961 (Booth et al., 1961).

Les proteïnes amb activitat glutatió S-transferasa estan codificades per dues superfamílies gèniques (Hayes & Strange, 2000):

1. **Família d'enzims solubles** que comprèn aproximadament uns 16 gens. Són enzims dimèrics implicats en el metabolisme de xenobiòtics i de compostos endògens.
2. **Família d'enzims microsomals:** comprèn uns 6 gens. Els enzims són trimèrics i estan implicats en el metabolisme de l'àcid araquidònic.

Totes dues famílies juguen un important paper en la protecció contra tòxics i productes de l'estrès oxidatiu.

## 5.1. FAMÍLIA D'ENZIMS SOLUBLES

### 5.1.1. ISOENZIMS CITOSÒLICS

Els isoenzims són entitats protèiques amb diferent origen genètic, que catalitzen la mateixa reacció enzimàtica però que poden tenir propietats diferents com ara el punt isoelèctric (PI), el pes molecular (PM), l'estabilitat tèrmica o les característiques cinètiques. Existeixen com a mínim 20 isoenzims citosòlics de les GST, el nombre exacte es desconeix (Hayes & Pulford, 1995).

En l'espècie humana els isoenzims citosòlics han estat assignats a vuit classes diferents. Les classes han estat identificades en funció de l'especificitat de substrat, afinitat química, comportament cinètic, seqüència d'aminoàcids i estructura. Així tenim les classes alfa, mi, kappa, pi, sigma, theta, zeta i omega. Totes elles es diferencien entre si per l'estructura dels seus gens i la localització cromosòmica (Hayes & Strange, 2000; Landi, 2000). El gen ancestral seria el de la classe theta que va evolucionar per donar lloc als gens que codifiquen pels isoenzims citosòlics (Strange & Fryer, 1999).

### 5.1.2. NOMENCLATURA

Les diferents espècies de glutatió S-transferases es designen amb les lletres GST seguides per una lletra en majúscula en funció de la classe. Un número aràbic defineix la subfamília.



Taula 5.1. Nomenclatura de les principals classes de glutatió S-transferases (Whalen & Boyer, 1998; Hayes & Strange, 2000).

CLASSE	PROTEÏNA	GEN
Alfa	GSTA1-1	GSTA1
Alfa	GSTA2-2	GSTA2
Alfa	GSTA3-3	GSTA3
Alfa	GSTA4-4	GSTA4
Kappa	GSTK1-1	GSTK1
Mi	GSTM1-1	GSTM1
Mi	GSTM2-2	GSTM2
Mi	GSTM3-3	GSTM3
Mi	GSTM4-4	GSTM4
Mi	GSTM5-5	GSTM5
Omega	GSTO1-1	GSTO1
Pi	GSTP1-1	GSTP1
Sigma	GSTS1-1	GSTS1
Theta	GSTT1-1	GSTT1
Theta	GSTT2-2	GSTT2
Zeta	GSTZ1-1	GSTZ1

### 5.1.3. FUNCIONS

Tenen una funció desactivadora de mutàgens carcinògens i d'altres compostos tòxics com: aflatoxina B, benzo[a]pirè, benzo[a]antracè, aldrin, benzoquinona, DDT, lindane, malatió, clorur de vinil i acroleïna entre d'altres. Aquesta funció la duen a terme gràcies a la seva activitat transferasa (Violet, 1993; Hayes & Pulford, 1995). La reacció de conjugació amb el glutatió constitueix el primer pas per la formació d'àcids mercaptúrics, que són un grup important de productes d'excreció. El resultat d'aquesta reacció no és sempre un metabòlit menys reactiu, ocasionalment el

resultat és una bioactivació del tòxic com és el cas de la conjugació amb alguns dihaloalcans i alquens i alquins halogenats.

També tenen un **paper protector davant dels hidroperòxids endògens generats per l'estrès oxidatiu** (activitat peroxidasa depenent de glutatió). Juguen doncs, un paper important en la protecció de les macromolècules enfront l'atac nucleòfil d'electròfils reactius. Les GST tenen l'habilitat d'inactivar les drogues anticanceroses. A banda de la seva activitat enzimàtica s'uneixen a altres compostos hidrofòbics com el grup hemo, bilirubina i hormones amb una possible **activitat transportadora** (Violet, 1993; Hayes & Pulford, 1995).

#### 5.1.4. DISTRIBUCIÓ

Aquests enzims estan àmpliament distribuïts entre els animals, plantes, fongs i bacteris, les GST es troben en gairebé tots els organismes eucariotes i bacteris (Hayes & Pulford, 1995). Representen del 5-10% dels enzims citosòlics hepàtics i estan presents en tots els teixits del cos humà (Whalen & Boyer, 1998).

#### 5.1.5. ESTRUCTURA

Les glutatió S-transferases citosòliques són proteïnes globulars dimèriques, funcionen com a homodímers principalment i en ocasions com a heterodímers, amb un sol centre actiu per subunitat. El tamany de cada subunitat oscil·la entre 17-28 KDa (Violet, 1993) i està formada per uns 200-240 aminoàcids (Whalen & Boyer, 1998).

Les cadenes polipeptídiques de cada subunitat formen dos dominis (Hayes & Pulford, 1995; Whalen & Boyer, 1998):

- Domini N-terminal: té estructura de làmina  $\beta$  i tres hèlixs  $\alpha$ . Constitueix majoritàriament el lloc d'unió a GSH o **Iloc G**.
- Domini C-terminal: té estructura de 5-6 hèlixs  $\alpha$  i constitueix majoritàriament el **Iloc H** o lloc d'unió als substrats hidròfobs i electròfils.

És important, en les classes alfa, mi, pi i sigma, un residu conservat de tirosina situat a prop de l'N-terminal que forma un pont d'hidrogen amb l'àtom de sulfur de l'anió tiolat (GS<sup>-</sup>) estabilitzant-lo, està implicat per tant en el mecanisme catalític ja que promou l'activació del GSH mitjançant la formació del tiolat. En el cas de la classe theta és un residu de serina (Ser<sup>11</sup>) l'implicat en la catàlisi. Els residus que formen el lloc H no estan tan conservats com els que formen el lloc G. (Hayes & Pulford, 1995; Whalen & Boyer, 1998; Landi, 2000).

Les GST també s'uneixen, com s'ha comentat abans, a compostos endògens que no actuen com substrats, el lloc d'unió és diferent del lloc H i lloc G i es troba al solc que formen les dues subunitats (Whalen & Boyer, 1998).

### **5.1.6. MECANISME D'ACCIÓ CATALÍTIC**

El glutatió (GSH) és un tripèptid, és la  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina (presenta un enllaç  $\gamma$ -amina). Es sintetitza a partir del glutamat, de la cisteïna i de la glicina per l'acció de dos enzims: la  $\gamma$ -glutamilcisteinasintetasa i la GSH sintetasa. Tant la síntesi com la seva degradació tenen lloc a l'interior de la cèl·lula i formen part del cicle del  $\gamma$ -glutamil el qual constitueix un sistema de transport d'aminoàcids cap a l'interior cel·lular.

El mecanisme d'acció de les GST és el següent: el GSH s'uneix al centre actiu de l'enzim i es transforma a pH neutre en l'anió tiolat, aquest anió té la capacitat d'atacar nucleòfilament i de manera espontània a compostos hidròfobs i electròfils situats a prop. Les GST per una banda promouen la formació de l'anió tiolat i per una altra uneixen compostos amb grups electròfils en un lloc d'unió proper al tiolat (Hayes & Pulford, 1995).

### **5.1.7. SUBSTRATS**

La majoria dels substrats de les GST són xenobiòtics o productes de l'estrès oxidatiu, el conjugat que s'obté (unit mitjançant un pont tioéter) és un compost menys reactiu, per tant l'acció de les GST és principalment protectora. Presenten molta especificitat pel substrat.

Alguns productes són per si mateixos substrats de la GST, d'altres necessiten una primera metabolització pel citocrom P450 per tal de ser-ho. Aquest és el cas de molts hidrocarburs policíclics aromàtics (HPA) com el benzo[a]pirè, benzo[a]antracè, 7-metil-benzo[a]antracè, 7,12-dimetilbenzo[a]antracè i 3-metilcolantrè (3-MC). Els carcinògens últims del HPA són metabòlits que contenen epòxids, alguns dels quals són substrat de les classes mi, pi i theta (Hayes & Pulford, 1995).

La classe alfa, mi i pi tenen com a substrats a carbonils  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturats, entre aquests trobem l'acroleïna present en el fum del tabac. La classe zeta té com a substrat l'àcid dicloracètic. La classe theta bioactiva el diclormetà a S-clormetilglutatió, també està implicada en l'activació depenent de glutatió del dibromoetà (Hayes & Strange, 2000).

Les GST també participen en el metabolisme normal del leucotriè  $A_4$  i de la prostaglandina  $H_2$ .

### 5.1.8. ACTIVITAT PEROXIDASA

Catalitza la reducció d'hidroperòxids orgànics als seus corresponents hidroalcohols. Aquesta reacció té lloc a través de l'atac nucleòfil pel GSH a l'oxigen electrofílic. Els substrats sobre els que actua són àcids grassos, fosfolípids i ADN hidroperòxids (Hayes & Pulford, 1995).

### 5.1.9. INDUCCIÓ I REGULACIÓ DE L'EXPRESSIÓ

La regulació de les GST es complexa, la seva expressió depèn del teixit i es poden induir per drogues i alguns compostos químics. La gran diversitat de compostos que augmenten l'expressió de les GST fa pensar en l'existència de varis mecanismes diferents d'inducció, un exemple serien els HPA que ho farien a través del receptor Ah (Hayes & Pulford, 1995; Landi, 2000).

## 5.2. ISOENZIMS I POLIMORFISMES

Les GST juguen un paper principal en la biotransformació dels tòxics, les variacions genètiques en aquests enzims influeixen en la resposta cel·lular als diferents agents

ambientals. El polimorfisme en les GST es va descriure a principis dels anys 80 en els eritròcits i en el fetge (Hayes & Strange, 2000).

### **5.2.1. CLASSE ALFA**

Els isoenzims trobats en fetge són homodímers o heterodímers formats per dues subunitats diferents, la subunitat A1 codificada pel gen GSTA1 i la subunitat A2 codificada pel gen GSTA2, que donen lloc a: GSTA1-1, GSTA1-2 i GSTA2-2. També s'ha trobat aquesta classe en teixits extrahepàtics, però tenen subunitats diferents a les del fetge, són les proteïnes GSTA3-3 i GSTA4-4 (Hayes & Strange, 2000).

Els gens de la classe alfa estan localitzats al cromosoma 6p12 i tenen una longitud entre 11-12 Kb, engloben 7 exons. Existeixen dos o tres gens funcionals i com a mínim 4 pseudogens (Strange & Fryer, 1999).

Existeix una marcada variació interindividual en l'expressió de GSTA1 i GSTA2 en els teixits. S'han trobat mutacions puntuals en la subunitat GSTA2 a les posicions dels aminoàcids 112 i 210 però les seves conseqüències no han estat descrites (Strange & Fryer, 1999; Hayes & Strange, 2000).

A1 i A2 s'expressen de manera important en hepatòcits, però s'han descrit casos ocasionals en els que no existia expressió. Estudis en rata mostren que la regió reguladora 5' del gen GSTA2 conté elements reguladors en cis que responen a HPA i antioxidants fenòlics (Strange & Fryer, 1999; Strange et al., 2000).

### **5.2.2. CLASSE KAPPA**

La proteïna GSTK1-1 es troba als mitocondris del fetge malgrat que pertany a la superfamília de les GST solubles (Pemble et al., 1996).

### **5.2.3. CLASSE MI**

Es van aïllar al fetge. És una classe altament polimòrfica. Hi han descrits 5 gens situats en tàndem al cromosoma 1p13.3 seguint la següent seqüència: 5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3', tenen 5 Kb i 8 exons (Strange & Fryer, 1999; Strange et al., 2000).



### 5.2.3.1. GSTM1-1

La GSTM1-1 s'expressa en fetge, estómac, cervell i d'altres teixits (Strange & Fryer, 1999). Intervé en la desactivació dels epòxids derivats del benzopirè, contaminants ambientals i aflatoxina B (Miller et al., 1997).

Existeixen diferents isoenzims en funció del polimorfisme que té lloc al residu 173 de la proteïna: GSTM1a-1a, GSTM1a-1b i GSTM1b-1b. Tots aquests isoenzims tenen la mateixa activitat catalítica però tenen diferents punts isoelèctrics (Strange et al., 2000).

#### Polimorfisme del gen GSTM1

El polimorfisme del gen GSTM1 va ser descrit per Seidegard l'any 1985. El gen GSTM1 presenta tres al·lells: existeix un al·lel nul (GSTM1\*0) degut a una delecció, i dues variants en funció d'una substitució d'un aminoàcid al residu 173 (exó 7), la variant GSTM1\*A té una lisina mentre que la GSTM1\*B té una asparragina (Hayes & Pulford, 1995). L'al·lel nul presenta una freqüència entre la població caucàsica del 50%. Les combinacions dels tres al·lells donen lloc a sis genotips, a quatre fenotips i a tres proteïnes diferents.

Taula 5.2. Combinació dels al·lells GSTM1\*0, GSTM1\*A i GSTM1\*B.

AL·LEL	GENOTIP	FENOTIP	PROTEÏNA
GSTM1*A	GSTM1*A/ GSTM1*A	GSTM1 A	GSTM1a-1a
	GSTM1*A/ GSTM1*0		
GSTM1*B	GSTM1*A/ GSTM1*B	GSTM1 AB	GSTM1a-1b
	GSTM1*B/ GSTM1*B		
GSTM1*0	GSTM1*B/ GSTM1*0	GSTM1 B	GSTM1b-1b
	GSTM1*0/ GSTM1*0		
		GSTM1 nul	Absència de proteïna



### 5.2.3.2. GSTM3-3

S'expressa sobretot en cervell i poc en pulmó. La seva expressió es creu que està influenciada per la GSTM1-1 (Hayes & Strange, 2000).

#### Polimorfisme del gen GSTM3

El gen GSTM3 es localitza al cromosoma 1p13.3 i en una orientació inversa a la resta de membres de la família mi (Hayes & Strange, 2000).

Al 1995 es van identificar dos al·lels: GSTM3\*A i GSTM3\*B, per la presència d'un polimorfisme al intró 6 del gen, l'al·lel GSTM3\*B presenta una delecció de 3bp en aquest intró. A més l'al·lel GSTM3\*B es troba en desequilibri de lligament amb GSTM1\*A (Inskip et al., 1995; Strange & Fryer, 1999; Hayes & Strange, 2000).

### 5.2.4. CLASSE OMEGA

Identificada recentment, existeix en vàries espècies de mamífers. En els humans la proteïna és la GSTO1-1 i s'expressa en molts teixits. Presenta activitat transferasa i dehidroascorbat reductasa (Board et al., 2000). El gen que la codifica es localitza al cromosoma 10q23-25 (Hayes & Strange, 2000).

### 5.2.5. CLASSE PI

La proteïna GSTP1-1 s'ha purificat a partir d'òrgans extrahepàtics, és la GST que més s'expressa en pulmó. Presenta una elevada especificitat pel BPDE. Els gens d'aquesta classe estan situats al cromosoma 11q13, tenen 3Kb i 7 exons (Hayes & Pulford, 1995; Miller et al., 1997).

#### Polimorfisme del gen GSTP1

Va ser descrit per Board (Board et al., 1989). Presenta 4 al·lels que es diferencien en l'aminoàcid de les posicions 105 i 114 de la proteïna:

- GSTP1\*A (Ile<sup>105</sup>-Ala<sup>114</sup>)
- GSTP1\*B (Val<sup>105</sup>-Ala<sup>114</sup>)
- GSTP1\*C (Val<sup>105</sup>-Val<sup>114</sup>)

- GSTP1\*D (Ile<sup>105</sup>-Val<sup>114</sup>)

El polimorfisme Ile → Val a la posició 105 està causat per una transició A→G al nucleòtid +313 (exó 5); i el polimorfisme Ala→ Val a la posició 114, per una transició C→T al nucleòtid +341.

El polimorfisme al·lèlic que presenta degut a la substitució d'un aminoàcid a la posició 105, isoleucina per valina, dóna lloc a dues proteïnes amb una activitat catalítica presumiblement diferent envers a alguns carcinògens derivats del metabolisme del benzopirè. Segons alguns autors els enzims que contenen Val<sup>105</sup> són 7 vegades més eficients per metabolitzar els diolepòxids que els que contenen Ile<sup>105</sup>. L'aminoàcid 105 està situat a prop del centre actiu de l'enzim, en la regió d'unió del substrat electrofílic, és per tant un aminoàcid crític i pot influir en la seva activitat (Miller et al., 1997; Hayes & Strange, 2000).

L'aminoàcid 114 no està situat a prop del centre actiu de l'enzim i no se sap la conseqüència funcional del polimorfisme A114V, però es creu que augmenta els efectes del polimorfisme a la posició 105. S'ha observat desequilibri de lligament entre aquests dos polimorfismes (Harris et al., 1998).

### 5.2.6. CLASSE SIGMA

La proteïna és la GSTS1-1 i es troba al fetge fetal i a la medul·la òssia. El seu gen està localitzat al cromosoma 4q21-22 (Hayes & Strange, 2000).

### 5.2.7. CLASSE THETA

En humans es van aïllar GSTT1-1 i GSTT2-2 a partir de fetge. La GSTT1-1 és un homodímer i cada subunitat té 25,3KDa. Els gens GSTT1 i GSTT2 estan situats al cromosoma 22q11, el GSTT1 té 8Kb i el GSTT2 en té 4Kb. Tots dos tenen una estructura similar amb 5 exons i tots dos són polimòrfics (Landi, 2000).

Una delecció de la totalitat del gen GSTT1 o de part d'ell dóna lloc a l'al·lel nul (GSTT1\*0) i té com a resultat l'absència de proteïna GSTT1-1 si és homozigot, en aquests casos es veu reduïda la capacitat de conjuguar glutatió amb dibrometà,

dicloretà i bromur de metil. La freqüència de l'al·lel nul varia en funció de les ètnies, en la població caucàsica està present en un 20% aproximadament (Strange & Fryer, 1999; Landi, 2000). L'al·lel positiu és el GSTT1\*1.

El polimorfisme en el gen GSTT2 ha estat descrit recentment, dóna lloc a un canvi d'aminoàcid a la posició 139, metionina per isoleucina.

### **5.2.8. CLASSE ZETA**

La proteïna GSTZ1-1 es troba al múscul esquelètic i al fetge fetal. El seu gen es situa al cromosoma 14q24.3 (Blakburn et al., 1998).

En el gen GSTZ1 s'han identificat variants al·lèliques que difereixen en la capacitat de metabolitzar dicloracetat i fluoracetat (Hayes & Strange, 2000).

## **6. EPÒXID HIDROLASA**

Les epòxid hidrolases (E.C.3.3.2.3.) són una família d'enzims hidrolítics (les  $\alpha/\beta$ -hidrolases) que hidraten als epòxids simples i òxids d'arè per donar lloc a diols veïnals i a trans-dihidrodiols respectivament (Tzeng et al., 1998; Fretland & Omiecinski, 2000). S'han caracteritzat les següents cinc classes d'aquests enzims en funció de les seves diferents característiques immunològiques i estructurals (Omiecinski et al., 2000):

1. Enzim microsomal amb especificitat de substrat pel colesterol 5,6-òxid: colesterol 5,6-òxid hidrolasa.
2. Hepoxilina A3 hidrolasa citosòlica.
3. Leucotriè A4 hidrolasa
4. I per últim dos enzims encarregats del metabolisme xenobiòtic: forma soluble i forma microsomal.

### **Colesterol 5,6-òxid hidrolasa**

Catalitza la hidratació del colesterol 5,6  $\alpha$ - i 5,6 $\beta$ -òxid a colestà 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol, és un enzim microsomal que es troba en tots els teixits analitzats però presenta més activitat en els teixits hepàtics.

### **Hepoxilina A3 hidrolasa**

És un enzim citosòlic que participa en el metabolisme dels metabòlits de l'àcid araquidònic. Aquesta proteïna és ubíqua, però ha estat estudiada principalment en teixits vasculars i del sistema nerviós central.

### **Leucotriè A4 hidrolasa**

Els leucotriens, el precursor dels quals és l'àcid araquidònic, tenen un paper important en la resposta al·lèrgica i inflamatòria. La leucotriè A4 hidrolasa té una doble funció: hidrolasa i aminopeptidasa.

El gen que codifica per aquest enzim està localitzat al cromosoma 12q22, conté 9 exons i codifica per una proteïna de 54 KDa. En el seu processament existeix *splicing* alternatiu.

### **Epòxid hidrolasa soluble**

És un enzim que metabolitza els xenobiòtics i els derivats epòxid dels àcids grassos endògens. S'expressa en tots els teixits. El gen que la codifica està localitzat al cromosoma 8p21-p12 i el seu producte és de 45 Kb aproximadament, està format per 19 exons i el primer exó és no codificant. Aquest enzim presenta variació entre poblacions.

### **Epòxid hidrolasa microsomal**

La forma microsomal de l'epòxid hidrolasa és la que serà subjecte d'estudi.

## **6.1. EPÒXID HIDROLASA MICROSOMAL**

### **6.1.1. FUNCIO**

L'epòxid hidrolasa microsomal (mEH) és un enzim implicat en el metabolisme de fase I que es troba principalment en el reticle endoplasmàtic llis i rugós (Seidegard & DePierre, 1983). Catalitza, mitjançant la trans-addició d'aigua, la transformació dels epòxids electròfils, altament reactius, en els seus corresponents trans-dihidrodiols,

més polars i per tant més fàcilment excretables (Hasset et al., 1994a). En principi, té una funció protectora però en alguns casos els seus productes poden ser posteriorment metabolitzats, per enzims oxidants, a compostos amb epòxids secundaris els quals no són un substrat gaire bo per la mEH i per tant no podran ser inactivats per aquest enzim. Aquests compostos diols-epòxids solen ser molt reactius i poden estar implicats en processos carcinogènics i teratogènics. Així en aquest cas l'acció de la mEH és la d'activació de tòxics (Hasset et al., 1997).

Al 1950 Boyland va proposar que la hidroxilació dels hidrocarburs policíclics aromàtics es duia a terme mitjançant un intermediari epòxid i que aquesta reacció tenia lloc enzimàticament. Al principi dels 70 es va fer evident la proposta de Boyland, la mEH es requereix per l'activació dels PAH (Gonzalez & Kimura, 1999).

No juga cap paper important en el desenvolupament dels mamífers ni en la homeostasi fisiològica. La seva absència produeix un canvi en la sensibilitat envers la toxicitat dels diferents xenobiòtics (Gonzalez & Kimura, 2001).

### 6.1.2. DISTRIBUCIÓ

La mEH es troba, amb activitats diferents, en bacteris, fongs, plantes, insectes, peixos, amfibis, ocells, rosegadors i humans (Oesch et al., 1991).

S'expressa en tots els teixits, òrgans i tipus cel·lulars (Hasset et al., 1994b; Omiecinski et al., 2000), s'observen, però, nivells més elevats en el fetge, ronyó, testicles, pulmons i limfòcits (Seidegard & DePierre, 1983; Raaka et al., 1998). En les diferents regions del fetge la seva distribució és semblant a la del citocrom P450. En humans no presenta diferències d'expressió en funció del sexe (Hasset et al., 1997).

### 6.1.3. PROTEÏNA

Està formada per una sola cadena polipeptídica de 455 aminoàcids (proteïna monomèrica) (Oesch et al., 1991; Hasset et al., 1994b), de pes molecular aproximat de 50 KDa, determinat per electroforesi i pel coeficient de sedimentació. En absència de detergent la mEH s'agrega en forma d'oligòmer amb un pes molecular de 600 KDa aproximadament. Presenta traces de ferro, zinc, coure, manganès i molibdè (Seidegard & DePierre, 1983).



Conté un nombre elevat de triptòfans, de tirosines i de residus no polars. L'N-terminal, el primer aminoàcid del qual és la metionina, presenta similituds amb l'N-terminal del precursor de diferents formes del citocrom P450.

En ser un enzim de membrana els lípids del voltant influeixen en la seva activitat. El pH òptim de l'enzim aïllat amb l'estirè 7,8-òxid com a substrat és entre 8,9-9,4, que és similar al trobat als microsomes, cal dir que el pH òptim varia en funció del substrat.

Les vies reguladores post-transcripcionals poden ser importants en la determinació dels nivells constitutius de l'activitat funcional de la mEH (Omiecinski et al., 1994). És un enzim que pot ser induït pels xenobiòtics i presenta polimorfisme (Hasset et al., 1994a).

#### **6.1.4. SUBSTRATS I INHIBIDORS**

Els substrats de la mEH són principalment els metabòlits epòxids dels xenobiòtics que es generen en les reaccions d'oxidació de la fase I, però intervé també en el metabolisme dels esteroides endògens (Raaka et al., 1998).

La mEH presenta especificitat per una ampla varietat de substrats amb preferència pels epòxids hidrofòbics sense llargues substitucions: estirè 7,8-òxid, octè 1,2-òxid, naftalè 1,2-òxid, benzè òxid, benzo[a]pirè 4,5-òxid, benzo[a]pirè 7,8-òxid, benzo[a]pirè 9,10-òxid, benzo[a]pirè 11,12-òxid, benzo[a]antracè 5,6-òxid, 3-metilcolantrè 11,12-òxid entre d'altres (Seidegard & DePierre, 1983; Oesch et al., 1991).

Els seus inhibidors són: metalls pesants divalents (els més potents són el Zn i el Hg), ciclopropiloxirà i 1,1,1-tricloropropè-2,3-òxid (Fretland & Omiecinski, 2000).

#### **6.1.5. MECANISME D'ACCIÓ**

La mEH catalitza l'addició d'aigua als epòxids per donar lloc als transdihidrodiols en una reacció de dos passos: un atac inicial al lloc actiu carboxilat de l'oxirà, que es transforma en un intermediari éster i la posterior hidròlisi d'aquest éster (Lauglin et al., 1998).

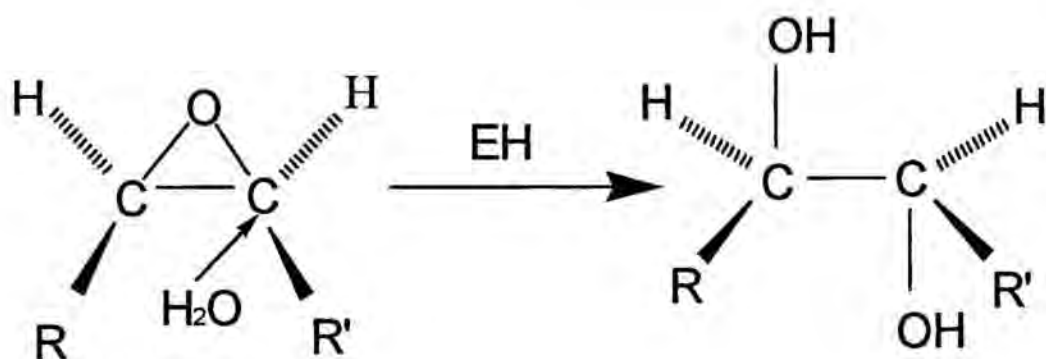


Fig. 6.1. Reacció catalitzada per la mEH.

Està implicat un mecanisme de catàlisi bàsica: l'ió OH format a partir de la molècula d'aigua per una histidina situada a prop del centre actiu de l'enzim, ataca nucleòfilament al carboni amb menys impediment estèric dels que formen l'epòxid (Seidegard & DePierre, 1983; Oesch et al., 1991). L'enzim és enantioselectiu i regiospecífic i com a producte dóna lloc a un únic isòmer amb una activitat òptica pura.

Els residus implicats en la catàlisi són bàsicament: His<sup>431</sup>, Asp<sup>226</sup>, Glu<sup>404</sup>. Presenta com un túnel hidrofòbic estret en el lloc catalític de manera que no és capaç de hidrolitzar els epòxids voluminosos trans-substituïts, això també suggereix el paper dels residus 320-328 en la interacció de la mEH amb altres proteïnes, probablement generadores d'epòxids com el citocrom P450.

En funció de les característiques estructurals i estereoquímiques dels xenobiòtics la mEH pot desactivar, no jugar cap paper o bé bioactivar.

### 6.1.6. GEN EPHX1

La mEH està codificada pel gen EPHX1 situat al cromosoma 1p-11q, la seqüència del qual està altament conservada. Només s'ha identificat un únic gen funcional i un ARNm (Oesch et al., 1991; Hasset et al., 1994b).

Aquest gen està format per 9 exons i 8 introns. L'exó 1 no codifica per la proteïna sinó que la seqüència codificant comença al nucleòtid número 6 de l'exó 2. La longitud del transcrit primari nuclear és de 20.271 pb, s'ha determinat però, la regió a 5' de l'inici de transcripció i la regió a 3' del lloc de poliadenilació, per tant la longitud total del gen mEPHX1 és de 24.790 pb. Presenta nombroses seqüències Alu dins dels introns exceptuant una d'elles que es troba en un exó (Hasset et al., 1994b).

La regió reguladora a 5' de l'inici de la transcripció del gen mEPHX1 té les següents característiques (Wilson & Omiecinski, 1989; Hasset et al., 1994b):

1. No té caixa CAAT.
2. La caixa TATA va ser identificada a la posició-32.
3. Conté un lloc d'unió CTF d'alta afinitat (-273 fins-279), un *core enhancer* element SV40 (-519 fins -527), un lloc HNF-5 (-314 fins -320) i un XRE entre les posicions -1907 i -1918.

Existeixen evidències que la mEH està regulada per múltiples exons que no es tradueixen, flanquejats per promotors específics pels teixits (Gaedigk et al., 1997).

## 6.2. POLIMORFISMES DE L'EPÒXID HIDROLASA MICROSOMAL

Els polimorfismes en el gen EPHX1 van ser descrits per primera vegada l'any 1988 (Skoda et al., 1988).

### 6.2.1. POLIMORFISMES A LA REGIÓ CODIFICANT

S'han identificat dos polimorfismes en la zona codificant, un a l'exó 3 i l'altre a l'exó 4 (Smith & Harrison, 1997):

- **Polimorfisme a l'exó 3:** la transició T→C al codó 113, produeix una substitució d'una tirosina (Y) per una histidina (H), l'activitat enzimàtica en aquest cas es pot veure reduïda.
- **Polimorfisme a l'exó 4:** en el codó 139 el polimorfisme està entre una histidina (H) i la variant arginina (R) degut a una transició A→G, aquest fet podria augmentar l'activitat de l'enzim.

L'al·lel salvatge no presenta cap d'aquests dos canvis. L'estranya coincidència d'ambdues mutacions simultànies en el mateix gen donaria lloc a una mEH amb activitat normal.

S'ha postulat la idea que la variació en els residus 113 i 139 no afecten a la funció catalítica de l'enzim sinó a la seva estabilitat, a la seva velocitat de recanvi (Laurenzana et al., 1998; Omiecinski et al., 2000).

Un tercer polimorfisme al codó 119 (lys<sup>119</sup>) s'ha identificat en població japonesa (Yoshikawa et al., 2000), és una transició G→A, que no té cap conseqüència fenotípica ja que el nou codó és sinònim a l'anterior. L'interessant d'aquest polimorfisme és que l'al·lel His113 presenta desequilibri de lligament amb l'al·lel salvatge del polimorfisme en la posició 119.

## 6.2.2. POLIMORFISMES A LA REGIÓ NO CODIFICANT

Pel que fa a la regió no codificant 5' de l'inici de la transcripció, s'han identificat set polimorfismes de canvi de base en les següents posicions: -200, -259, -290, -362, -399, -613 i -699, afecten a la regulació de l'activitat transcripcional del gen EPHX1. Dels set polimorfismes sis dels canvis de base són transicions, cinc són de la classe C→T i una del tipus A→G; l'única transversió G→T existeix a -290bp. Tots aquests polimorfismes s'agrupen en dos grups de lligament: -200, -259, -290 per una banda i -362, -613, -699 per una altra. Els polimorfismes situats a -362 i -613 són cadascun capaços, de modificar l'activitat transcripcional en un 30% aproximadament, el mecanisme molecular és desconegut però s'ha observat que la major activitat transcripcional mesurada correspon als polimorfismes que presenten C o G a la posició variant en comptes d'A o T, donant per tant un possible paper al pont d'hidrogen addicional en el mecanisme molecular. El lloc -290 és a prop d'una seqüència consens de reconeixement de l'element NF-1. Recentment s'ha identificat un nou polimorfisme situat en la regió no codificant a 3' de l'inici de la transcripció, concretament en la posició +66 (Raaka et al., 1998).

En població Japonesa (Saito et al., 2001) s'han descrit 33 SNPs, dels quals 6 estan localitzats a la regió flanquejant 5', 17 en introns, 8 en exons, i 2 en la regió flanquejant 3'.



### **6.2.3. EFECTE DELS POLIMORFISMES SOBRE L'ACTIVITAT DE L'ENZIM**

Es pot concloure que l'expressió funcional de la mEH podria estar afectada:

1. Pels polimorfismes en els exons 3 i 4.
2. Pels polimorfismes en seqüències reguladores de la transcripció del gen.
3. Pels mecanismes post-transcripcionals que també poden estar subjectes a variacions genètiques. Variacions en l'estabilitat de l'ARNm i de la proteïna resultant i diferències en la capacitat de traducció dels diferents trànscrips polimòrfics (Hasset et al., 1997).
4. Per l'inducció gènica pels agents mediambientals (Raaka et al., 1998).
5. Per la variació en els nivells de proteïnes post-transcripcionals necessàries per la l'expressió de la pròpia mEH (Raaka et al., 1998).

## **7. SUSCEPTIBILITAT AL CÀNCER I POLIMORFISMES GENÈTICS.**

Els polimorfismes genètics dels enzims implicats en el metabolisme dels xenobiòtics poden condicionar l'efecte tòxic dels mateixos. En el cas de l'exposició al fum del tabac o a contaminants ambientals, existeix variabilitat individual en l'activitat dels enzims encarregats de metabolitzar-los. La susceptibilitat individual al càncer és en part conseqüència del balanç activació-desactivació dels carcinògens o precarcinògens, que depèn de la capacitat catalítica dels enzims encarregats del seu metabolisme, que a la vegada es funció en part dels polimorfismes genètics en els gens que codifiquen per aquests enzims.

### **7.1. POLIMORFISMES DE LES GST I RELACIÓ AMB EL CÀNCER**

Board l'any 1981 va proposar la idea que els polimorfismes de les GST poguessin modificar la predisposició al càncer. Nombrosos estudis s'han dut a terme des



d'aleshores amb resultats contradictoris. S'accepta que els polimorfismes dels diferents gens GST poden influir en la susceptibilitat al càncer (Strange & Fryer, 1999), però el mecanisme d'acció és encara incert en la determinació de la susceptibilitat al càncer de pulmó, bufeta, laringe i a d'altres càncers (Strange et al., 2000).

### **7.1.1. GSTM1**

La GSTM1-1 pot inactivar als electròfils reactius amb capacitat d'actuar com a mutàgens, es per això que es va considerar que el seu polimorfisme podria estar relacionat amb la susceptibilitat al càncer associat al tabac (Houlston, 1999). Seidegard l'any 1985 va ser el primer que va relacionar la deficiència d'aquest enzim i el càncer de pulmó (Seidegard et al., 1986). Aproximadament en població caucàsica s'ha observat una freqüència del 50% de l'al·lel nul (Miller et al., 1997).

### **GSTM1 i càncer de pulmó**

Els primers treballs cas-control publicats demostraven una clara i important relació entre el polimorfisme nul i el risc de càncer de pulmó, però estudis posteriors van mostrar resultats contradictoris. El 1995 McWilliams et al. van realitzar un meta-anàlisi amb la conclusió d'una lleu associació entre el genotip nul i el càncer de pulmó, més tard el 1996 d'Errico et al. en van realitzar un altre amb un resultat semblant al de McWilliams. Al 1999 Houlston va publicar un meta-anàlisi en el que recollia alguns treballs publicats entre 1985 i 1998 sobre el polimorfisme del gen GSTM1 i la seva relació amb el càncer de pulmó, la seva conclusió va ser que aquest polimorfisme no modulava el risc de càncer de pulmó (McWilliams et al., 1995; d'Errico et al., 1996; Houlston, 1999). Altres autors (Miller et al., 1997) però afirmen que existeixen evidències que el genotip nul modula la susceptibilitat al càncer de pulmó en fumadors. Segons uns estudis recents l'efecte del genotip nul varia en funció de la dosi de tabac, així el seu efecte és més evident en individus que han fumat menys de 35 PY, malgrat que d'altres estudis no corroboren aquesta relació (Strange & Fryer, 1999).

De fet el paper que juga el polimorfisme GSTM1 és encara un tema controvertit.

## **GSTM1 i altres càncers**

Alguns autors han relacionat el genotip nul amb risc de càncer de laringe (Janhke et al., 1996; Jourenkova-Mironova et al., 1998b; Lafuente et al., 1998; Hanna et al., 2001).

En un estudi amb pacients afectats de càncer de pell, es va trobar que el genotip heterozigot AB tenia caràcter protector ja que era menys freqüent significativament entre els casos de carcinoma de cèl·lules bassals (Strange & Fryer, 1999).

### **7.1.2. GSTT1**

En estudis amb rates es va observar que un augment de l'expressió de GSTT1-1 podia prevenir alguns càncers, es va sospitar que en humans el polimorfisme de la GSTT1-1 podia estar relacionat amb la susceptibilitat al càncer d'origen tòxic (Landi, 2000).

### **GSTT1 i càncer de pulmó**

No existeix, actualment, evidència en caucàsics d'associació entre el genotip nul i un augment de risc de càncer de pulmó, malgrat que en alguns estudis es demostrí el contrari (Landi, 2000).

### **GSTT1 i altres càncers associats al tabac**

En principi en caucàsics no existeix relació entre el genotip de la GSTT1-1 i el càncer de bufeta i de laringe (Strange & Fryer, 1999), s'han publicat, però, alguns estudis (Jahnke et al., 1996; Jourenkova-Mironova et al., 1998b) on es troba una relació entre el genotip nul i el càncer de laringe.

### **7.1.3. GSTM3**

La caracterització al·lèlica del polimorfisme del gen GSTM3 va ser descrita al 1995 per Inskip et al. (Inskip et al., 1995). L'al·lel GSTM3\*B té una delecció de 3pb que dona lloc a l'existència d'un motiu de reconeixement d'un factor de transcripció. En aquest primer estudi la hipòtesi era que l'al·lel GSTM3\*B augmentava la susceptibilitat al càncer. Estudis posteriors no van trobar relació entre aquest

polimorfisme i el càncer de pulmó (Jourenkova-Mironova et al., 1998a; Saarikoski et al., 1998).

Actualment el paper de l'al·lel GSTM3\*B en relació al càncer de laringe no està prou clar, alguns estudis afirmen que és un factor protector ja que individus homozigots o heterozigots per l'al·lel GSTM3\*B tenen un risc menor de càncer escamós de laringe si es comparen amb els que són homozigots GSTM3\*A (Janhke et al., 1996; Saarikoski et al., 1998); però d'altres estudis diuen que l'al·lel GSTM3\*B és un al·lel de risc al càncer de laringe en fumadors (Jourenkova-Mironova et al., 1999)

#### **7.1.4. GSTP1**

S'ha estudiat la relació entre el polimorfisme a la posició 105 i la susceptibilitat al càncer. En un estudi (Ryberg et al., 1997) s'afirmava que l'al·lel GSTP1\*B (Val<sup>105</sup>) estava associat al càncer de bufeta, de testicles i també de pulmó ja que es va trobar un augment de freqüència d'homozigots GSTP1\*B/GSTP1\*B entre els casos; no es va trobar relació entre el genotip de la GSTP1 i la susceptibilitat a altres càncers com el de colon ni el de pit. També es va observar que la freqüència de l'al·lel GSTP1\*A (Ile<sup>105</sup>) estava lleugerament disminuïda en pacients de càncer de pròstata (Ryberg et al., 1997). Un treball posterior no va confirmar els resultats anteriors en relació al càncer de pulmó (Jourenkova-Mironova et al., 1998a). Pel que fa a la relació d'aquest polimorfisme i el risc de càncer de pròstata en un altre treball (Gsur et al., 2001) s'arriba a la conclusió que GSTP1 és un bon candidat a ser un biomarcador del risc de càncer de pròstata, de manera que el homes que són homozigots pels al·lells mutants tindrien menor risc que els homozigots per al·lel salvatge.

Pel que fa al càncer de laringe no s'ha trobat relació amb el polimorfismes del gen GSTP1 (Jourenkova-Mironova et al., 1999).

#### **7.1.5. RISC ASSOCIAT A LA COMBINACIÓ DE POLIMORFISMES**

Alguns contaminants ambientals i nombrosos components del fum del tabac són substrat per la GSTM1-1, GSTM3-3, GSTP1-1 i GSTT1-1, el risc de desenvolupar càncer associat a un sol genotip podria no ser tan important com el risc associat a la

combinació de determinats genotips (Houlston, 1999), per tant en principi els individus que tinguin defectiu més d'un sol d'aquests gens podrien tenir un risc associat major que qui té només un gen defectiu (Saarikoski et al., 1998).

L'estudi de la combinació del polimorfismes de la GSTM1 i GSTT1 dóna els següents resultats:

- La combinació GSTM1 nul i GSTT1 nul pot augmentar les aberracions cromosòmiques (Landi, 2000).
- No s'ha trobat associació entre el genotip GSTM1nul+GSTT1nul, i el risc al càncer de pulmó en el cas de grans fumadors, però en el cas de petits i mitjans fumadors sí que té més rellevància (Saarikoski et al., 1998; Landi, 2000).
- Els individus amb GSTT1nul+GSTM1nul podrien tenir un risc més elevat de desenvolupar carcinoma de pulmó de cèl·lules escatoses quan es compara amb individus amb altres combinacions (Saarikoski et al., 1998).
- El risc de càncer de laringe associat a la combinació GSTM1nul+GSTT1nul varia en funció de la població estudiada, els asiàtics tenen més risc que els caucàsics si tenen la combinació dels dos genotips, caldrà valorar també altres factors que poden influenciar en aquesta diferència (Landi, 2000).
- Si s'estudia en combinació amb altres genotips de susceptibilitat el genotip nul de la GSTM1 pot esdevenir un determinant significatiu del càncer de pulmó en fumadors (Miller et al., 1997).

S'ha postulat una relació entre l'expressió de GSTM3-3 al pulmó i el genotip de GSTM1, els fumadors que són GSTM1 nul podrien expressar menys GSTM3-3 en el pulmó (Inskip et al., 1995; Strange & Fryer, 1999). Individus amb una baixa expressió de GSTM3-3 al pulmó podrien tenir un risc elevat de patir adenocarcinoma de pulmó (Antilla et al., 1995).

Hi ha desequilibri de lligament entre GSTM1\*A i GSTM3\*B i s'ha postulat la hipòtesi que GSTM1\*A confereix un augment del risc degut a l'associació amb GSTM3\*B (Inskip et al., 1995).



## 7.2. RELACIÓ ENTRE ELS POLIMORFISMES DE LA mEH I CÀNCER

A principis dels anys 90 en varis estudis es va suggerir la possible associació entre la variació de l'activitat de la mEH i el risc a desenvolupar determinats tipus de càncers relacionats amb el consum de tabac, com el càncer de pulmó, d'esòfag, d'orofaringe i de bufeta (Heckbert et al., 1992).

Més tard es va descriure com afectaven els polimorfismes en els exons 3 i 4 del gen EPHX1 a l'activitat de la mEH (Hasset et al., 1994a), i a partir d'aquí s'han publicat articles en els que s'estudia la relació entre aquests polimorfismes i el risc a determinats tipus de càncer relacionats o no amb l'hàbit tabàquic.

La primera relació positiva entre un genotip de la mEH i el càncer es troba en un treball (McGlynn et al., 1995) sobre la susceptibilitat a l'hepatocarcinoma i els polimorfismes dels enzims implicats en el metabolisme de l'aflatoxina B<sub>1</sub>. Estudien el polimorfisme de l'exó 3 del gen EPHX1 entre d'altres, i conclouen que els individus exposats a l'aflatoxina B<sub>1</sub> amb el genotip mutant tenen un risc més elevat de desenvolupar la malaltia. Un estudi posterior (Tiemersma et al., 2001) confirma aquest resultat, els genotips 113HH i el 139HH augmentarien el risc de carcinoma hepatocel·lular.

### 7.2.1. CÀNCER DE PULMÓ

L'any 1997 es va publicar un estudi (Smith & Harrison, 1997) on no es va trobar relació entre el càncer de pulmó i genotips de la mEH. Es va demostrar una associació entre l'activitat de la mEH definida genèticament i la susceptibilitat a la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) i l'emfisema. Segons els autors els individus amb activitat lenta de la mEH són més susceptibles a MPOC i emfisema que els que hereten els al·lels de l'activitat normal de l'enzim.

Més tard un altre treball (Benhamou et al., 1998) va concloure que l'activitat de la mEH determinada genèticament estava fortament relacionada amb el risc de càncer de pulmó associat al tabac. El risc augmentava amb els fenotips ràpids. Els resultats van ser similars entre el càncer escamós i el de cèl·lules petites.



S'han realitzat estudis en població xinesa amb la conclusió que les variants al·lèliques del gen EPHX1 estan associades amb un augment del risc relatiu pel càncer de pulmó (Persson et al., 1999) i que existeix relació entre el fenotip ràpid i normal i el càncer de pulmó de cèl·lules escatoses, malgrat que la relació entre l'activitat de la mEH i els polimorfismes en els exons 3 i 4 és encara incerta (Lin et al., 2000). Aquest mateix estudi (Lin et al., 2000) afirma que el fum del tabac indueix la mEH, un increment significatiu en l'activitat de la mEH va ser trobat entre els fumadors en comparació amb els no fumadors.

El nombre de paquets per any (PY) acumulats podria jugar un important paper en el risc que representen un o altre genotip (Zhou et al., 2001), de manera que el genotip de molt baixa activitat podria esdevenir un factor relativament protector en els molt fumadors i un factor de risc en els no fumadors. Segons aquest estudi la interacció entre els PY acumulats i la mEH és estadísticament significativa en els casos de carcinoma de cèl·lules escatoses i és no significativa pels casos d'adenocarcinoma.

La influència dels polimorfismes genètics de la mEH sobre el risc de càncer de pulmó varia en funció del grup ètnic, així per exemple en un estudi (Wu et al., 2001) sobre els mexicans i afroamericans de Texas s'ha trobat que aquests polimorfismes estan associats al càncer de pulmó només en els individus joves de la població mexicana i a més existeixen diferències significatives en la distribució del polimorfisme de l'exó 4 en els dos grups.

## **7.2.2. CÀNCER DE LARINGE**

Els genotips de la mEH associats amb una elevada activitat de l'enzim poden estar relacionats amb un augment del risc dels càncers de la cavitat oral, faringe i laringe associats amb l'exposició del tabac.

S'ha relacionat, en un treball (Jourenkova-Mironova et al., 2000), un augment del risc de càncer de faringe i oral amb un increment de l'activitat de la mEH. El risc associat amb la predicció de l'activitat no es modificaria per la durada de l'hàbit tabàquic ni per l'exposició a l'alcohol. Els mateixos autors afirmen que existeix una interacció entre la predicció de l'activitat de la mEH i el genotip de la GSTM3 en el risc del càncer de laringe. Els que tenen la combinació de l'elevada activitat de la mEH i

GSTM3\*A/GSTM3\*B o GSTM3\*B/ GSTM3\*B tenen un risc 13 vegades més gran que els que tenen la combinació genotip lent de la mEH i genotip GSTM3\*A/GSTM3\*A.

### 7.2.3. ALTRES TIPUS DE CÀNCER

L'activitat lenta de la mEH pot ser un factor de risc pel càncer de colon. Segons un estudi (Harrison et al., 1999) els individus amb His113 tenen més de tres vegades més risc de patir càncer colorectal. Però no està tant clar ja que en un altre estudi (Cortessis et al., 2001) no es va trobar cap relació o es va trobar una molt baixa relació entre l'adenoma colorectal i els genotips de la mEH. Sí que es va trobar associació entre el genotip que prediu una alta activitat de l'enzim i l'adenoma quan es va estudiar la relació conjuntament amb l'hàbit de fumar i el genotip de la GSTM3, de manera que el risc augmentava si s'era fumadors o si be s'era GSTM3 AA. Un altre treball (Ulrich et al., 2001) no va trobar relació entre els polimorfismes de la mEH i el risc a pòlips colorectals, però sí que existeix un risc associat al genotip relacionat amb el fenotip lent si existeix hàbit tabàquic .

Pel que fa a la relació entre la mEH i el càncer d'ovari es podria dir, segons un estudi (Spurdle et al., 2001), que la mEH implicada en la bioactivació dels components del fum del tabac a formes mutagèniques no està involucrada en l'etiologia del càncer d'ovari en general però si que una taxa de metabolització ràpida (fenotip ràpid) pot disminuir el risc de càncer d'endometri.

### **III. OBJECTIUS**

## 8. OBJECTIUS

L'any 1995 es va iniciar una nova línia de recerca en el departament de Salut Pública de la Universitat de Barcelona sobre l'estudi de diferents polimorfismes genètics i metabòlics amb una possible relació amb la susceptibilitat al càncer induït per tabac i contaminants ambientals (especialment hidrocarburs policíclics aromàtics). Al llarg d'aquests anys han estat concedits 3 ajuts FIS pel desenvolupament d'aquest estudi (Nº 95/0529, Nº98/1390 i Nº00/0504). Fruit d'aquesta línia hi ha diferents publicacions en revistes internacionals i la present tesi doctoral.

L'objectiu principal d'aquesta tesi és el de valorar la possible modulació del risc carcinogènic pels polimorfismes de les glutatió S-transferases (GSTM1, GSTT1, GSTM3 i GSTP1) i de l'epòxid hidrolasa microsomal (EPHX1 exons 3 i 4) en el càncer de pulmó i en el de laringe. Per tal d'assolir aquest objectiu és necessari:

- Posar a punt i validar els mètodes d'anàlisi genètica per PCR dels polimorfismes dels gens EPHX1 en els exons 3 i 4, GSTM3 i GSTP1.
- Estudiar les freqüències d'aquests polimorfismes en:
  - Una mostra de 203 voluntaris fumadors sans extrets d'un programa de deshabitució tabàquica.
  - Una mostra de 177 malalts de càncer de pulmó i de 205 malalts de càncer de laringe.
- Ampliar l'estudi dels polimorfismes dels gens GSTT1 i GSTM1 en les poblacions abans esmentades. Aquests dos polimorfismes ja havien estat estudiats en una població de fumadors control i en una de malalts de càncer de pulmó amb un nombre menor d'individus.
- Fer un estudi:
  - De la possible desviació de freqüències en els grups de malalts.
  - De la relació dels polimorfismes amb el risc d'aparició de càncer de pulmó i de laringe.
  - De la valoració del risc considerant l'efecte del sexe i del consum de tabac.

També es realitzarà una anàlisi de les freqüències d'aquests polimorfismes:

- S'estudiarà l'equilibri de Hardy-Weinberg en la població de fumadors control.
- Entre els gens EPHX1 (exons 3 i 4), GSTM1 i GSTM3, tots ells situats al mateix cromosoma, s'estudiaran possibles desequilibris de lligament.
- Es farà un estudi comparatiu de les freqüències gèniques i al·lèliques en aquesta població amb d'altres freqüències publicades en diferents grups ètnics.



## **IV. MATERIAL I MÈTODES**

## 9. DISSENY DE L'ESTUDI

Aquest treball és un estudi epidemiològic cas-control. Els estudis cas-control s'inclouen dins dels dissenys observacionals analítics (Bolúmar, 2001). És retrospectiu, el punt de partida és la malaltia i s'estudien els seus antecedents per esbrinar si existeix relació entre l'aparició de la malaltia i un determinat factor de risc. Es defineixen dos grups diferents, els casos i els controls, que es classifiquen en funció de la presència o absència de la malaltia respectivament. Un cop s'han definit els grups s'estudien com a possibles factors de risc diferents genotips dels gens: GSTM1, GSTM3, GSTT1, GSTP1 i EPHX1.

S'estudiaran primerament les freqüències genotípiques i al·lèliques de cadascun dels gens polimòrfics (GSTM1, GSTT1, GSTM3, GSTP1, EPHX1 exons 3 i 4) en els casos i en els controls.

Es durà a terme també, un estudi del possible desequilibri de lligament entre els gens GSTM1, GSTM3 i EPHX1, tots ells situats al mateix cromosoma 1.

### 9.1. DESCRIPCIÓ DE LA MOSTRA

En el nostre estudi els **casos** són una mostra de malalts de càncer de pulmó i de malalts de càncer de laringe. Els **controls** són una mostra d'individus fumadors sans.

Els casos han de ser representatius de la malaltia. Van ser escollits per diferents criteris d'inclusió:

- Tots els malalts de càncer de pulmó o laringe consecutius diagnosticats a l'hospital en un període determinat
- Caucàsics i residents a l'àrea metropolitana de Barcelona
- Història clínica disponible
- Diagnòstic recent, clar i inequívoc
- Consentiment informat de la seva participació en l'estudi.

Una possible variable de confusió seria el fet de que gairebé tots els casos són fumadors, per tant el grup control estarà format per individus fumadors. Uns altres

factors de confusió serien l'edat i el consum de tabac (dosi), aquests es tindran en compte en l'anàlisi estadístic posterior. El consum de tabac es mesura en paquets any (PY, *Packs Year*). Els PY es calculen, a partir de la història referida de l'individu, multiplicant el nombre de paquets que es fuma en un dia l'individu, pels anys que porta fumant.

A més també es realitzarà un estudi del risc associat a cada polimorfisme en funció de la dosi de fum de tabac a la que ha estat exposat un individu. També el sexe podria influir en l'estudi, hi ha molt poca representació del sexe femení, per això farem un estudi paral·lel només considerant la població masculina.

### 9.1.1. FUMADORS CONTROL

La mostra està formada per 203 individus fumadors sans del programa de deshabituació del tabac, Departament de Medicina Preventiva, Universitat de Barcelona, recollida durant els anys 1994-2000. Tots ells participen en aquest estudi de manera voluntària i van donar el seu consentiment informat.

La població és caucàsica, tots van néixer a Espanya amb domicili a l'àrea metropolitana de Barcelona com a mínim des de fa 10 anys.

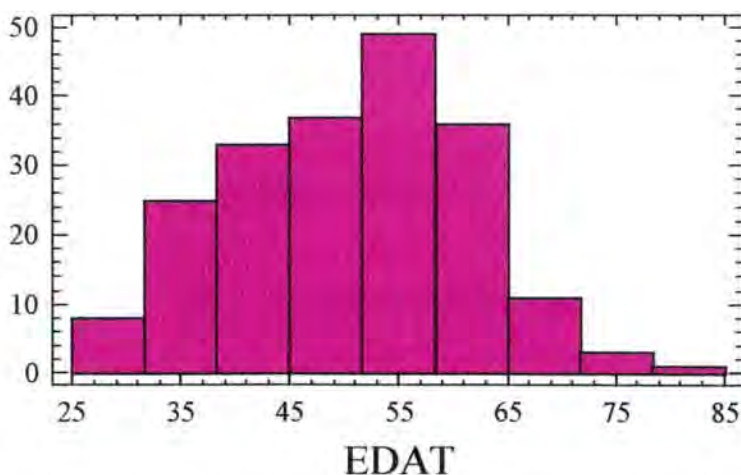


Fig. 9.1. Distribució per edat del grup de fumadors control.

La mitjana d'edat al moment de ser inclosos en l'estudi era de  $50 \pm 10$  anys, l'interval va de 28 a 82 anys. Pel que fa al sexe 171 són homes i 32 dones.

La intensitat de l'hàbit tabàquic ve donada en PY i la mitjana és de  $47 \pm 27$  PY, l'interval va de 7-196 PY.

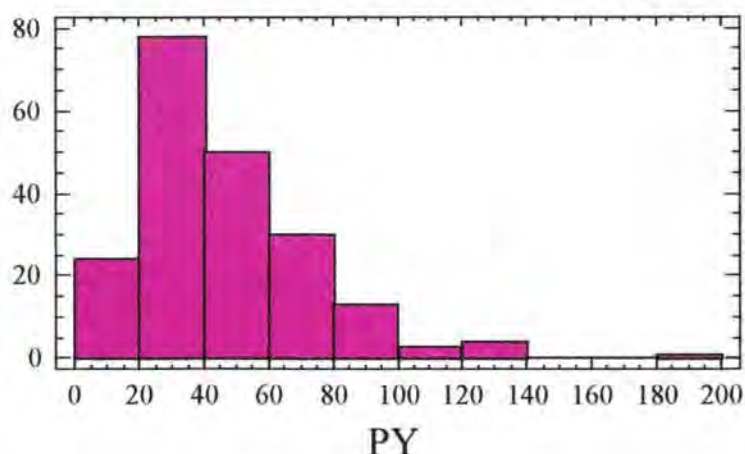


Fig. 9.2. Distribució per PY del grup de fumadors control.

Es va valorar també l'exposició laboral coneguda a carcinògens i l'estat de salut, no presentaven cap tipus de càncer que pogués estar relacionat amb el tabaquisme.

### 9.1.2. MALALTS DE CÀNCER DE PULMÓ

La mostra està formada per 177 malalts diagnosticats de carcinoma broncogènic al Servei d'Oncologia de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, recollida durant els anys 1995-1999. La seva participació ha estat voluntària i segons els criteris del comitè ètic de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

Des del punt de vista histopatològic, van ser classificats segons les normes de l'OMS en quatre subgrups principals: carcinoma de cèl·lules escatoses ( $n=61$ ), carcinoma de cèl·lules grans ( $n=14$ ), carcinoma de cèl·lules petites ( $n=56$ ) i adenocarcinoma ( $n=46$ ). Els pacients amb altres histologies o amb una histologia dubtosa no van ser inclosos en aquest estudi.



Són caucàsics, nascuts a Espanya i residents a l'àrea metropolitana de Barcelona. La mitjana de l'edat en el moment del diagnòstic i de l'extracció de sang per l'estudi és  $60 \pm 11$  anys, l'interval va de 32 a 87 anys. Pel que fa al sexe la distribució és la següent: 162 homes i 15 dones.

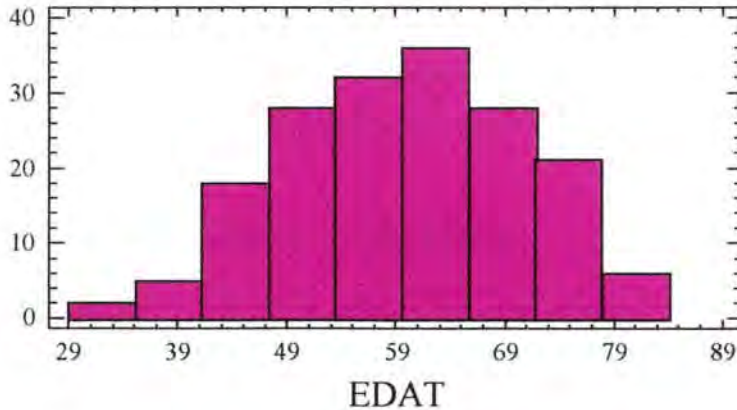


Fig. 9.3. Distribució per edat del grup de malalts de càncer de pulmó.

El 98% dels malalts són fumadors i la intensitat del seu hàbit tabàquic és de  $55 \pm 27$  PY, i l'interval va de 0-170 (tenint en compte als no fumadors).

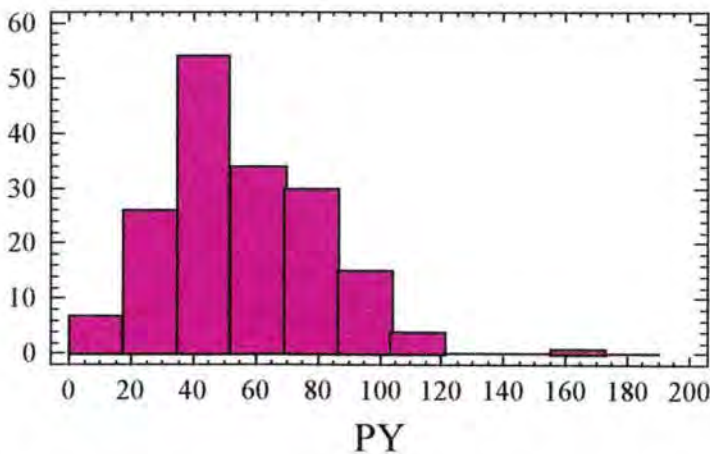


Fig. 9.4. Distribució per PY dels malalts de càncer de pulmó.



Es va obtenir en cada cas una història detallada sobre l'exposició laboral a carcinògens i antecedents familiars de càncer. El grup seleccionat no presentava exposició laboral coneguda a carcinògens. Els malalts que presentaven altres tipus de càncer o altres patologies majors van ser exclosos de l'estudi.

### 9.1.3. MALALTS CÀNCER DE LARINGE

Població representada per una mostra de 205 malalts de càncer de laringe (202 homes i 3 dones) diagnosticats de carcinoma de cèl·lules escatoses (127 glòtic i 78 supraglòtic) entre els anys 1998-1999 al servei d'otorrinolaringologia de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge i entre els anys 1999-2001 al servei d'otorrinolaringologia de l'Hospital Clínic de Barcelona. Participen en l'estudi de manera voluntària.

Són caucàsics, nascuts a Espanya amb domicili a l'àrea metropolitana de Barcelona.

La mitjana d'edat és de  $60 \pm 10$  anys (interval de 30 a 86 anys).

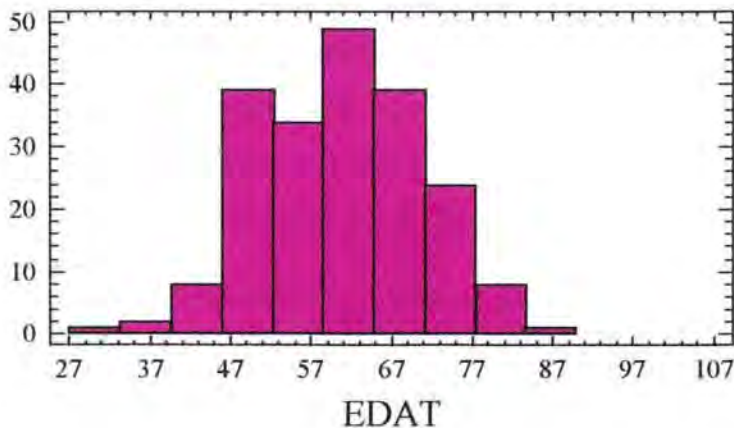


Fig. 9.5. Distribució per edat dels malalts de càncer de laringe.

La intensitat de l'hàbit tabàquic és de  $53 \pm 27$  PY (interval de 0 a 190), existeixen 5 malalts no fumadors.

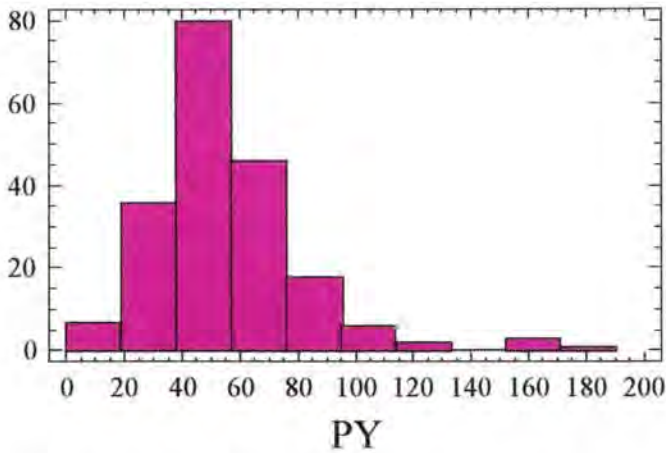


Fig. 9.6. Distribució per PY dels malalts de càncer de laringe.

De cada malalt se sap el consum de tabac i d'etanol, l'exposició laboral coneguda a carcinògens i el seu estat de salut. Es van rebutjar per l'estudi tots aquells que presentaven altres patologies importants.

Tant els malalts com els controls van ser informats sobre els objectius de l'estudi i van donar el seu consentiment per escrit per tal d'incloure'ls en el protocol d'extracció de sang i de genotipat.

El disseny de l'estudi ha estat aprovat pel comitè ètic de L'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

## 9.2. RECEPCIÓ DE LES MOSTRES

Les mostres es processen immediatament o com a màxim es guarden un dia a 4°C.

Es fa un control de cada mostra amb un registre o fitxa que inclou:

- Un número d'ordre seguit de dues lletres (CP: Malalts de càncer de Pulmó, CL: Malalts de càncer de Laringe i FC: Fumadors Control).
- Nom i cognoms del pacient.
- Procedència de la mostra.
- Domicili.
- Lloc i data de naixement.

- Edat (al moment del diagnòstic, o de l'extracció de sang).
- Sexe.
- PY.
- Consum d'etanol.
- Histopatologia i localització de tumor (en els casos).
- Data extracció de limfòcits.
- Data extracció de l'ADN.
- Concentració de l'ADN i quantitat d'ADN total.
- Altres observacions.

## 10. MÈTODES DE LABORATORI

Els polimorfismes que s'estudien en aquest treball són polimorfismes de línia germinal. L'estudi en limfòcits una sola vegada és suficient per a caracteritzar el polimorfisme ja que no presenta variació al llarg de la vida.

La qualitat de l'ADN és crítica per a que l'anàlisi dels polimorfismes genètics sigui correcte, així l'obtenció del l'ADN es farà a partir de mostres de sang total. No es requereix que l'individu estigui en dejú (Blömeke & Shields, 1999).

### 10.1. OBTENCIÓ DE L'ADN

Si es parteix de mostres de sang fresca el primer que cal fer per l'obtenció de l'ADN és l'extracció de cèl·lules sanguínies mononucleades.

Mitjançant centrifugació de la mostra de sang amb gradient de densitat s'aconsegueix separar les cèl·lules mononucleades de la resta de cèl·lules sanguínies. El gradient de densitat està creat per HISTOPAQUE®-1119 que conté polisacarosa i diatrizoat de sodi (Sigma®, 1994).

Si es sotmet el tub a centrifugació, les cèl·lules mononucleades es queden a la interfase HISTOPAQUE®-1119/plasma, i els granulòcits i eritròcits precipiten al fons del tub.

Es recupera amb un pipeta pasteur la interfase on es troben les cèl·lules mononucleades i es renten. Es centrifuga i les cèl·lules precipitaran al fons de tub. Es descarta el sobrenedant i es procedeix a l'extracció de l'ADN.

Per obtenir ADN pur cal eliminar proteïnes i d'altres restes cel·lulars. Primer es lisen les cèl·lules obtingudes per que alliberin el seu contingut d'àcids nucleics, s'utilitza un tampó de lisi amb els següents components: NaCl 100mM, TRIS 10Mm, EDTA 25Mm i 0,5% de SDS (l'SDS és un agent desnaturalitzant de proteïnes, i l'EDTA és un inhibidor de les DNases) (Ausubel et al., 1989).

Posteriorment es fa una digestió amb proteïnasa K, que és un enzim proteolític, per tal d'eliminar les proteïnes.

Un cop acabada la digestió es realitza l'extracció de l'ADN amb fenol-cloroform-alcohol isoamílic, es formaran dues fases després d'agitar i centrifugar, els àcids nucleics estan a la fase aquosa i les proteïnes a la fase orgànica (en aquest cas més densa que l'aquosa). Es separa la fase aquosa i es descarta la fase orgànica.

El fenol és un bon agent desnaturalitzant de proteïnes, però no inhibeix completament a la RNAsa, però amb l'ús del cloroform i de l'isoamil alcohol es soluciona el problema. L'extracció amb cloroform elimina les restes de fenol dels àcids nucleics.

Per tal de concentrar l'ADN de la fase aquosa, es precipita amb etanol pur en presència de l'acetat d'amoni 7,5M com a catió monovalent el qual redueix la precipitació dels dNTPs. Es centrifuga i es renta l'ADN i s'eliminen les restes d'etanol fins a obtenir un precipitat sec. Es resuspèn el precipitat amb aigua esterilitzada, i es quantifica.

La quantificació de l'ADN es du a terme mitjançant espectrofotometria UV a les longituds d'ona de 280 i 260. La mesura a 260 permet el càlcul de la concentració de l'ADN tenint en compte que el valor 1 de densitat òptica (DO) correspon aproximadament a 50  $\mu$ g/ml d'ADN de doble cadena o a 40  $\mu$ g/ml per ADN o ARN de cadena simple. La mesura de l'absorbància a 280 mesura el contingut proteic. La relació (ratio) entre la DO obtinguda a 260 i la DO a 280 dóna una estimació de la puresa de l'ADN obtingut: en general l'ADN pur té una ratio superior a 1,8, en canvi



les barreges ADN-proteïna al 50% presenten una ratio inferior a 1,5, la ratio també és inferior a 1,8 si queden restes de fenol. (Maniatis et al., 1987; Ausubel et al., 1989).

De  $10^9$  cèl·lules es poden extreure aproximadament 2mg d'ADN de llargària com a mínim de 100Kb (Ausubel et al., 1989).

Un cop s'ha quantificat es prepara la concentració de treball que en el nostre cas és de 100ng/ $\mu$ l.

## 10.2. REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Mitjançant la tècnica de la PCR s'amplifiquen fragments dels gens EPHX1 i GSTM1, GSTT1, GSTP1 i GSTM3 que contenen els polimorfismes. La reacció en cadena de la polimerasa ha esdevingut una de les més poderoses tècniques utilitzades en biologia molecular; s'utilitza per amplificar selectivament un segment d'ADN que es troba flanquejat per dues regions de seqüència coneguda.

Dos oligonucleòtids, complementaris a aquestes seqüències flanquejants conegudes, són utilitzats com a encebadors per una sèrie de reaccions de síntesi catalitzades per l'ADN polimerasa.

El primer pas és **desnaturalitzar** per calor (90-95°C) l'ADN patró en presència d'un excés dels dos oligonucleòtids i dels quatre dNTPs. La barreja de la reacció després és refredada fins a una temperatura (50°C) que permet als oligonucleòtids hibridar amb la seva seqüència diana (seqüència complementària) també s'anomena a aquest procés **annealing**. L'últim pas és l'**extensió** (72°C), a partir dels oligonucleòtids hibridats, per l'ADN polimerasa (síntesi del segment d'ADN).

El cicle de desnaturalització, **annealing** i extensió es repeteix unes quantes vegades. L'ADN sintetitzat en un cicle pot servir de motlle per cicles posteriors per tant la síntesi de l'ADN per aquesta tècnica és exponencial.

Aquest però no és un procés il·limitat, la quantitat de l'ADN polimerasa esdevé limitant als 25-30 cicles (Maniatis et al., 1987).



## 10.2.1. COMPONENTS DE LA PCR

### 10.2.1.1. OLIGONUCLEÒTIDS

Solen tenir com a mínim 16 nucleòtids de longitud, la longitud més adient és entre 20-24. El contingut en GC ha de ser del 40-60% distribuïdes uniformement. S'ha d'evitar que siguin complementaris amb ells mateixos o amb altres oligonucleòtids amb que es treballa (especialment a l'extrem 3').

El nucleòtid més a l'extrem 3' no ha de ser una T, ja que aquest és el nucleòtid que més tolera un aparellament incorrecte, disminuint l'especificitat. Tanmateix també cal evitar a la zona 3' més de 3 C o G seguides perquè també això permetria aparellaments incorrectes.

Normalment es treballa a una concentració de  $1\mu\text{M}$ , que és suficient per 30 cicles d'amplificació, la presència de concentracions majors d'oligonucleòtids pot causar hibridacions inespecífiques. Pel contrari la PCR és extremadament ineficient si la concentració dels oligonucleòtids és limitant (Maniatis et al., 1987).

Els oligonucleòtids poden estar marcats o no amb un fluorocrom en funció del mètode utilitzat posteriorment per a la identificació del fragments amplificats. Si estan marcats el producte de PCR presentarà fluorescència.

### 10.2.1.2. TAMPONS

El tampó per la PCR conté: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl i 1,5mM  $\text{MgCl}_2$ . Dóna un pH de 8,3 a 20°C, però en augmentar la temperatura baixarà fins 6,8-7,8.

La presència d'ions divalents és crítica. Els ions magnesi són superiors als de manganès, i els ions calci són inefectius. Degut a que la concentració òptima de  $\text{Mg}^{+2}$  és molt baixa (1,5mM), és molt important que la preparació de l'ADN patró no contingui concentracions elevades de quelants tipus EDTA o d'ions carregats negativament com els fosfats. Els dNTPs són la principal font de fosfats i qualsevol canvi en la seva concentració podria afectar a la disponibilitat del  $\text{Mg}^{+2}$ . La concentració de Mg afecta a l'astringència i a la desnaturalització així com a l'activitat de la polimerasa (és un factor crític per l'activitat de les ADN polimerases). Una concentració massa elevada de  $\text{MgCl}_2$  estabilitza l'ADN de doble cadena impedit una desnaturalització total, també estabilitza hibridacions inespecífiques,

augmentant la quantitat de productes no desitjats. Pel contrari una concentració massa baixa redueix la quantitat de producte amplificat .

### 10.2.1.3. TAQ ADN POLIMERASA

Tenen la funció 5'→3' polimerasa i exonucleasa però no tenen la funció 3'→5' exonucleasa. Si hi ha excés existeix risc d'inespecificitats.

L'ús de polimerases termoestables en les reaccions de PCR evita haver d'afegir enzim en cada nou cicle, simplificant molt el procés.

### 10.2.1.4. dNTPs

Es fan servir a concentracions saturants de 200  $\mu\text{M}$  per cada dNTP, això suposa un excés de dNTPs respecte a l'ADN patró, el que fa que la concentració dels dNTPs es mantingui gairebé constant. El pH serà de 7,0 per la barreja dels dNTPs. Per evitar incorporacions errònies cal que tots els dNTPs estiguin a la mateixa concentració i que aquesta no sigui major de 200 $\mu\text{M}$ .

### 10.2.1.5. SEQÜÈNCIA DIANA

La longitud de l'ADN que s'ha d'amplificar no és en principi un factor crític.

És important la qualitat de l'ADN que es fa servir com a patró, ja que restes de fenol, EDTA i proteïnasa K, entre d'altres, són potents inhibidors de la Taq polimerasa.

### 10.2.1.6. ALTRES COMPONENTS ADDICIONALS

BSA: estabilitza a la Taq Polimerasa

FORMAMIDA: incrementa l'especificitat en regions riques en GC

DIMETIL SULFÒXID (DMSO): accelera la renaturalització de les cadenes i dóna estabilitat tèrmica a l'àcid nucleic contra la depurinació.

GLICEROL: es creu que augmenta l'estabilitat tèrmica de la polimerasa i disminueix la temperatura necessària per la separació de les cadenes.

SULFAT D'AMONI: afecta a la temperatura d'*annealing* i de desnaturalització de l'ADN.

SINGLE STRAND BINDING PROTEIN: accelera l'*annealing* mentre que inhibeix l'extensió d'hibridacions inespecífiques (Sigma®, 1997).

## 10.3. ELECTROFORESI D'ADN

L'electroforesi és un mètode de separació, identificació i també de purificació de l'ADN. Aquest se separa en funció del seu tamany quan migra a través d'un gel d'agarosa o poliacrilamida amb un voltatge determinat.

### 10.3.1. ELECTROFORESI EN GELS D'AGAROSA

És una tècnica que s'utilitza tant per a la detecció dels productes amplificats per la PCR, per comprovar que s'ha amplificat el fragment desitjat (en el cas concret dels polimorfismes en els gens GSTT1 i GSTM1 això ja permet identificar els genotips positiu i nul en funció de la presència o absència respectivament de producte amplificat), com per a la identificació dels fragment de restricció de longitud polimòrfica (RFLP) després d'una digestió de l'ADN amplificat per PCR amb un enzim de restricció.

La mostra es prepara amb el producte de la PCR o de la digestió al que s'afegeix una barreja de colorants: blau de bromofenol i xilencianol, que indicaran per on avança l'electroforesi, i glicerol per donar densitat a la mostra.

S'aplica una diferència de voltatge a través del gel i l'ADN que a pH neutre està carregat negativament, migrarà cap al pol positiu.

Per tal de visualitzar-lo s'utilitza bromur d'etidi. L'etidi és un catió aromàtic pla que s'intercala en l'ADN de doble cadena produint sota la llum UV una fluorescència molt més intensa que la que té per si sol (Escarmís, 1985; Maniatis et al., 1987).

### 10.3.2. ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA

La poliacrilamida és un polímer format per acrilamida i N,N'-metilenbisacrilamida. La polimerització té lloc en barrejar aquests dos components amb persulfat amònic i TEMED. Es formen llargues cadenes d'acrilamida entrecruades per bisacrilamida i formen un gel, la porositat del qual depèn de la longitud de les cadenes d'acrilamida

que depèn de la seva concentració (des de 3,5 fins al 20%) i del grau d'entrecreuament.

S'utilitzaran en aquest estudi gels de poliacrilamida d'alta resolució per a seqüenciadors amb làser. Per tal d'identificar els fragments amplificats cal que aquests presentin fluorescència, per tant els oligonucleòtids de la PCR estaran marcats amb un fluorocrom. S'utilitzen condicions desnaturalitzants si els fragments d'ADN que es volen separar són de cadena senzilla. Quan es fa la PCR només un dels dos oligonucleòtids està marcat amb fluorescència de manera que quan es fa córrer en el gel només es detecta una sola cadena (la cadena marcada).

Les mostres abans de carregar es barregen amb tampó de càrrega que conté: formamida, blau de bromofenol i xilencianol. Es desnaturalitzen per calor, la formamida impedeix la reassociació de les dues cadenes, i es fan córrer en el gel. El gel també conté una concentració elevada d'agent desnaturalitzant que ajuda a mantenir separades les dues cadenes complementàries (Maniatis et al., 1987).

La resolució d'un gel de poliacrilamida és molt major que la d'un gel d'agarosa, permetent la discriminació de fragments que difereixen en un sol nucleòtid de tamany. Serà la tècnica emprada per la identificació dels al·lels del gen GSTM3 ja que el producte de PCR pels dos al·lels presenta una diferència de longitud de 3pb.

## **10.4. IDENTIFICACIÓ DELS POLIMORFISMES**

### **10.4.1. DIGESTIÓ AMB ENZIMS DE RESTRICCIÓ**

Per detectar els polimorfismes en els gens GSTM3, GSTP1, EPHX1 exó3 i EPHX1 exó4 es necessita l'ús d'enzims de restricció.

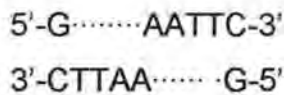
Els enzims de restricció són endonucleases que reconeixen regions curtes de l'ADN i el tallen, el tall pot ser en el mateix lloc de reconeixement o bé a una certa distància.



Existeixen tres tipus d'enzims de restricció: I, II i III; els que s'utilitzen en enginyeria genètica són els de tipus II (Griffiths et al., 1995).

La seqüència que reconeixen els enzims de restricció de tipus II és de tipus palíndrom, és a dir una seqüència capicua, la lectura en el sentit 5'→3' d'una de les cadenes de l'ADN és igual a la de l'altre cadena també llegida en direcció 5'→3'.

Poden donar lloc a extrems cohesius o extrems roms, per exemple: *Eco RI* donarà lloc a extrems cohesius:



*Hae III* té la següent diana de restricció i donarà lloc a extrems roms:



La longitud dels fragments d'ADN que apareixen després de sotmetre aquest a l'acció d'un enzim de restricció que talla les cadenes en punts concrets, dianes de restricció, pot variar entre individus. Aquesta variació (polimorfisme) pot ser deguda a mutacions que afecten als punts de tall o bé a diferent tamany de l'ADN entre dues dianes de restricció degut a insercions o deleccions.

A vegades pot passar que la mutació que es vol detectar no forma part de cap diana de restricció, en aquests casos es pot introduir artificialment una diana de restricció mitjançant el canvi d'alguns nucleòtids dels oligonucleòtids, com és el cas del mètode descrit per Smith i Harrison per l'estudi del polimorfisme a l'exó3 del gen EPHX1 (Smith & Harrison, 1997; Blömeke & Shields, 1999):

#### 10.4.2. AS-PCR (ALLELE SPECIFIC-PCR)

Els oligonucleòtids de la PCR es dissenyen per amplificar preferencialment un dels al·lels. Aquesta tècnica permet detectar mutacions puntuals, així com petites deleccions i insercions (Sommer et al., 1992; Blömeke & Shields, 1999). Serà la tècnica emprada per l'estudi dels polimorfismes GSTM1 i EPHX1 exó3.



Es realitzen dues reaccions de PCR per cada mostra, les dues tenen un oligonucleòtid en comú -1- i un oligonucleòtid específic per cada al·lel -2A, 2B (específics pels al·lells A i B respectivament)- que tenen diferent l'extrem 3'. Així per exemple, l'oligonucleòtid 2A hibridarà només amb la seqüència que correspon a l'al·lel A i amb la seqüència de l'al·lel B es produirà un aparellament erroni de manera que no serà estable el dúplex o si ho és la Taq polimerasa no podrà fer l'elongació, per tant només existirà amplifcació en el cas que la mostra contingui l'al·lel A, i el mateix passarà amb 2B.

En l'electroforesi, es fa córrer en el gel d'agarosa cada mostra en dos carrils, en un carril (A) es carrega el producte de la PCR que tenia l'oligonucleòtid 2A i en l'altre carril (B) el del 2B. Si només s'obté una banda en el carril A és perquè l'individu és homozigot per l'al·lel A, si s'obté una banda en cada carril és heterozigot AB i si només s'obté en el carril B és homozigot B.

Les condicions de la PCR han de ser molt ajustades per evitar inespecificitats, per tant es recomanable concentracions de  $MgCl_2$  baixes (<3.5mM) i concentració dels oligonucleòtids també baixes 0,05-0,10 $\mu$ M (Sommer et al., 1992).

### 10.4.3. POLIMORFISMES DE TAMANY

Els al·lells presenten diferència de longitud o tamany, si aquesta diferència és gran la resolució de l'electroforesi en gel d'agarosa és suficient per identificar-los; si la diferència de tamany és petita és necessari una electroforesi en gels de poliacrilamida.

## 10.5. ANÀLISI DELS POLIMORFISMES

En el nostre laboratori per dur a terme la reacció de PCR es treballa amb un tampó 10x (500mM de KCl i 100mM de tris),  $MgCl_2$  25mM, els oligonucleòtids tenen una concentració de 10pmols/ $\mu$ l, els dNTPs de 10mM i la taq ADN polimerasa té una concentració de 5u/ $\mu$ l.

### 10.5.1. POLIMORFISME GSTM1

El gen GSTM1 presenta tres al·lels: GSTM1\*A, GSTM1\*B i GSTM1\*0. L'al·lel GSTM1\*0 presenta una delecció, que si està en homozigosi té com a conseqüència que la proteïna no s'expressa. Els al·lels GSTM1\*A i GSTM1\*B es diferencien en 1pb a l'exó 7, GSTM1\*A té una lisina al residu 173 mentre que GSTM1\*B té una asparragina.

Es realitzen dues reaccions de PCR:

1. Primera reacció de PCR (To-Figueras et al., 1996): per veure la presència o absència de GSTM1. El producte de PCR és de 165pb.
2. Segona reacció de PCR (To-Figueras et al., 1997): reacció de subtipat per AS-PCR, amplificació de l'intró 6 i de l'exó 7 del gen GSTM1. El producte de PCR és de 132pb.

Les amplificacions es realitzen amb 3 oligonucleòtids:

- Un oligonucleòtid (intró 6), comú a GSTM1\*A i a GSTM1\*B.
- 2 Oligonucleòtids (exó 7): un específic per GSTM1\*A i l'altre per GSTM1\*B.

Es sap que l'oligonucleòtid específic per GSTM1\*B no hibrida amb la seqüència de GSTM1\*A i viceversa.

#### Primera reacció de PCR

Oligonucleòtids utilitzats:

Oligonucleòtid 1: 5'-GAA GGT GGC CTC CTC CTT GG-3'

Oligonucleòtid 2: 5'-AAT TCT GGA TTG TAG CAG AT-3'

El volum final de la reacció és de 25µl que contenen aproximadament 300ng d'ADN patró, 5pmols de cada oligonucleòtid, 250µM de cada dNTP, 50mM de KCl, 10mM tris, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> i 0,75 unitats de taq ADN polimerasa. El protocol exacte és :

H <sub>2</sub> O	14,85µl
Tampó	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
dNTP	2µl
Oligonucleòtid 1	0,5µl
Oligonucleòtid 2	0,5µl
Taq ADN polimerasa	0,15µl
ADN patró	3µl

Les condicions de l'amplificació són les següents: 1 min a 95°, 30 cicles de 45s a 95°C→45s a 55°C→1 min a 72°C i l'última extensió és de 3 min a 72°.

El termociclador és el GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler. En la reacció s'inclou un control negatiu (sense ADN) i un control positiu.

La **identificació** es fa per electroforesi submarina amb bromur d'etidi en gel d'agarosa al 2%: l'aparició o no d'una banda a 165 pb permet diferenciat entre GSTM1\*0 i GSTM1 positiu. Es fa córrer també un marcador de tamany amb una escala de 100pb. En la fotografia del gel d'agarosa (figura 10.1.) es pot observar que només una mostra de les carregades en els pous davant del marcador de tamany de 100pb (pou número 6) té el genotip positiu, concretament la mostra carregada en el pou número 5, la resta de pous de l'1 al 4 contenen mostres a les que els hi correspon un genotip nul.

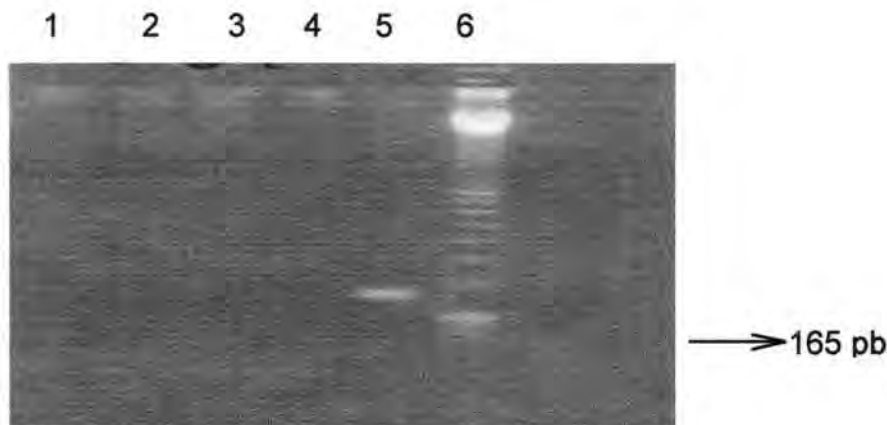


Fig. 10.1. Resultats de la primera reacció de PCR del polimorfisme GSTM1.

## Segona reacció de PCR

Oligonucleòtids:

Oligonucleòtid1 (intró 6): 5'-GCT TCA CGT GTT ATG AAG GTT C-3'

Oligonucleòtid2 A (exó 7): 5'-TTG GGA AGG CGT CCA AGC GC-3'

Oligonucleòtid2 B (exó7): 5'-TTG GGA AGG CGT CCA AGC AG-3'

Reacció de PCR amb volum final 20 $\mu$ L que conté 100ng d'ADN patró, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M de cada dNTP, 10mM de tris-HCl, 50mM de KCl, 20 pmols de cada oligonucleòtid i 0.5 unitats d'ADN polimerasa (Ampli Taq Gold™).

H <sub>2</sub> O	10,1 $\mu$ l
Tampó	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	1,2 $\mu$ l
dNTP	1,6 $\mu$ l
Oligonucleòtid 1	2 $\mu$ l
Oligonucleòtid 2 A/B	2 $\mu$ l
Taq ADN polimerasa	0,1 $\mu$ l
ADN patró	1 $\mu$ l

Reacció amb *hot start* per activar a l'ADN polimerasa: 11min a 95°C→5 cicles: 45s a 94°C, 1 min a 59°C, 2 min a 72°C→30 cicles: 30s 94°C, 30s a 58°C, 45s a 72°C. El termociclador és el GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler. En la reacció s'inclouen controls positius i negatius.

La **identificació del genotip** es du a terme en electroforesi submarina amb bromur d'etidi en gel d'agarosa al 2%. Es carreguen per parelles (dos pous per cada mostra). Corren paral·lelament a un marcador de tamany de 100bp. El producte de les dues PCR té el mateix tamany, 132pb. Si apareix una banda en el primer pou a 132 pb i no apareix cap en el segon pou, a la mostra li correspondrà un genotip de positiu A (GSTM1\*A/GSTM1\*0 o GSTM1\*A/GSTM1\*A), si existeix banda a tots dos carrils el genotip serà AB (GSTM1\*A/GSTM1\*B), i si només existeix banda al carril

del segon pou el genotip serà positiu B ( $GSTM1^*B/GSTM1^*0$  o  $GSTM1^*B/GSTM1^*B$ ).

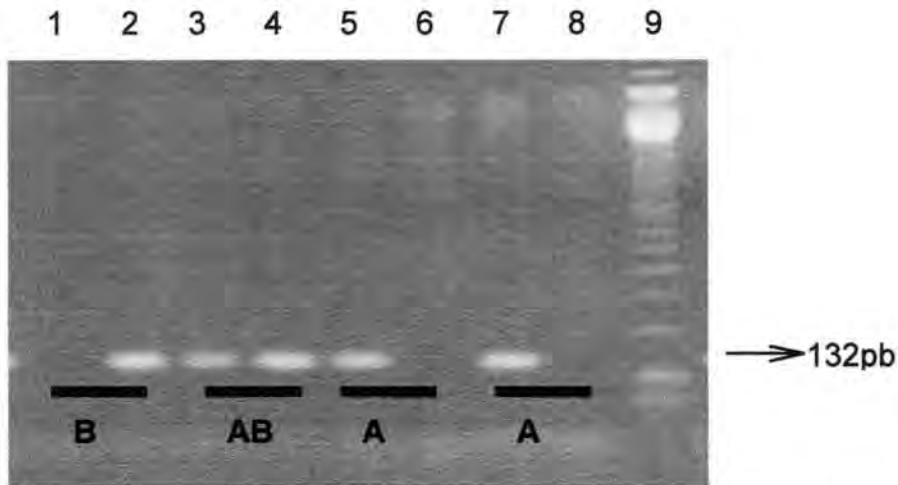


Fig. 10.2. Resultats obtinguts de la segona reacció de PCR del polimorfisme *GSTM1*.

A la figura 10.2 els carrils 1 i 2 corresponen a una mostra amb el genotip positiu B ja que només s'observa banda en el pou on s'ha carregat el producte de la PCR específica per l'al·lel B. Els carrils 3 i 4 pertanyen a una mostra amb el genotip positiu AB ja que es veu banda als dos carrils. Els carrils 5 i 6 corresponen a una mostra *GSTM1* positiu A, només es veu una banda en el carril corresponent a la PCR específica per l'al·lel A.

Aquest mètode per subtipar els *GSTM1* positius no permet diferenciar entre  $GSTM1^*A/GSTM1^*A$  i  $GSTM1^*A/GSTM1^*0$  ni entre  $GSTM1^*B/GSTM1^*B$  i  $GSTM1^*B/GSTM1^*0$ .

### 10.5.2. POLIMORFISME *GSTM3*

El gen *GSTM3* presenta dos possibles al·lels :

- *GSTM3^\*A*: la seva seqüència presenta 3 dianes de restricció per l'enzim *MnII*
- *GSTM3^\*B*: presenta una delecció de 3pb a l'intró 6. Té 2 dianes de restricció per *MnII*, la delecció dels 3pb està just a dins d'una diana de restricció per aquest enzim.



Per estudiar aquest polimorfisme es fan servir dos mètodes diferents, el mètode A que és PCR-RFLP (Iskip et al., 1995), i el mètode B per polimorfisme de tamany del producte de la PCR.

### 10.5.2.1. MÈTODE A: PCR-RFLP

Mitjançant la reacció de PCR s'amplifiquen l'exó6-intró6-exó7 del gen GSTM3.

Els oligonucleòtids que es van fer servir són:

Oligonucleòtid 1: 5'-CCT CAG TAC TTG GAA GAG CT-3'

Oligonucleòtid 2: 5'-CAC ATG AAA GCC TTC AGG TT-3'

La **reacció de PCR** té un volum final de 30µl que conté 125ng d'ADN patró, 200µM de cada dNTP, 30pmols de cada oligonucleòtid, 50mM de KCl, 10mM de tris-HCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> i 0,6 unitats de taq ADN polimerasa.

H <sub>2</sub> O	15,43µl
Tampó	3µl
MgCl <sub>2</sub>	1,8µl
dNTPs	2,4µl
Oligonucleòtid 1	3µl
Oligonucleòtid 2	3µl
Taq ADN polimerasa	0,12µl
ADN patró	1,25µl

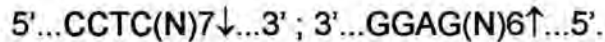
La reacció va començar amb 2 min a 93° i va continuar amb 35 cicles de temperatura (50s a 94°C, 45s a 55°C i 1min 30s a 72°C) i una extensió final de 5 min a 72°. Es va dur a terme en GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler amb un control negatiu i un positiu.

Per l'electroforesi submarina amb bromur d'etidi en gel d'agarosa al 2% es comprova que la reacció de PCR hagi sortit bé, es veu una banda a 273pb per l'amplificació de l'al·lel GSTM3\*A i de 270 pel GSTM3\*A. La resolució en gel d'agarosa no és

suficient per detectar aquesta diferència de 3pb, per tant es veurà una sola banda cap a 270pb aproximadament.

Per fer la **digestió** es va purificar el producte de PCR amb columnes Ultrafree®-MC Centrifugal (Millipore™).

L'enzim és el ***MnII*** la diana de restricció del qual és:



La reacció de restricció amb un volum final de 12µl és la següent:

H <sub>2</sub> O dd MQ autoclavada	1,2µl
Tampó MBI <b><i>Y/TANGO</i></b> amb BSA	1,2µl
Enzim <b><i>MnII</i></b> MBI fermentas (10 unitats/µl)	0,3µl
Producte PCR purificat	9,3µl

S'incuben les mostres O/N a 37°C (aproximadament 18 hores). Juntament amb les mostres es digereixen un control GSTM3\*A/ GSTM3\*A, un control GSTM3\*A/ GSTM3\*B i un GSTM3\*B/ GSTM3\*B.

La **identificació dels al·lels** es du a terme mitjançant electroforesi submarina amb bromur d'etidi en gel d'agarosa, Nusieve3:1 FMC™ al 3%.

Els productes de la digestió (tant les mostres com els controls) corren paral·lelament a un marcador de tamany de 100pb. L'al·lel A presenta tres dianes de restricció per l'enzim *MnII* i l'al·lel B només dues, per tant les bandes que han d'aparèixer són les següents:

GSTM3\*A/ GSTM3\*A: 11, 51, 86 i 125 pb.

GSTM3\*A/ GSTM3\*B: 11, 51, 86, 125 i 134 pb.

GSTM3\*B/ GSTM3\*B: 11, 125 i 134 pb.

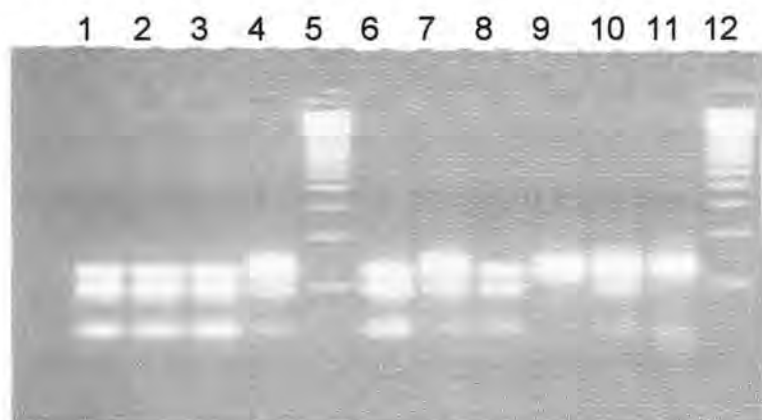


Fig. 10.3. Genotipat del polimorfisme *GSTM3* pel mètode PCR-RFLP.

A les mostres carregades en els tres primers pous de la fig.10.3, els hi correspon un genotip AA, en la del quart pou AB, en el cinquè pou s'ha posat un marcador de tamany de 100 pb, una mostra BB es trobaria al novè pou. La banda de 11 pb no es pot visualitzar en el gel d'agarosa

### 10.5.2.2. MÈTODE B

Com ja s'ha mencionat abans el producte de PCR dels dos al·lels *GSTM3*\*A i *GSTM3*\*B té tamany diferent (3pb) i l'electroforesi en gels d'agarosa no té una resolució suficientment elevada per detectar aquesta diferència, en canvi els gels de poliacrilamida si que permeten diferenciar entre 3pb. Farem doncs una electroforesi en gels de seqüenciació de poliacrilamida al 6% en condicions desnaturalitzants. L'electroforesi es va dur a terme en un seqüenciador monocrom *Automated Laser Fluorescent (ALF) ADN Sequencer (Pharmacia)* a 1450 volts, 38 mA i 50° amb una potència de làser de 3mW durant 220 minuts.

La reacció de PCR és la mateixa que en el mètode A però l'oligonucleòtid1 està marcat amb fluoresceïna. El producte de PCR es barreja amb uns marcadors de tamany interns de 100 i de 250pb i corre paral·lelament a un marcador de tamany extern que va de 50 a 500pb.

En aquestes condicions es pot identificar els dos al·lels per la diferència de longitud dels fragments amplificats.

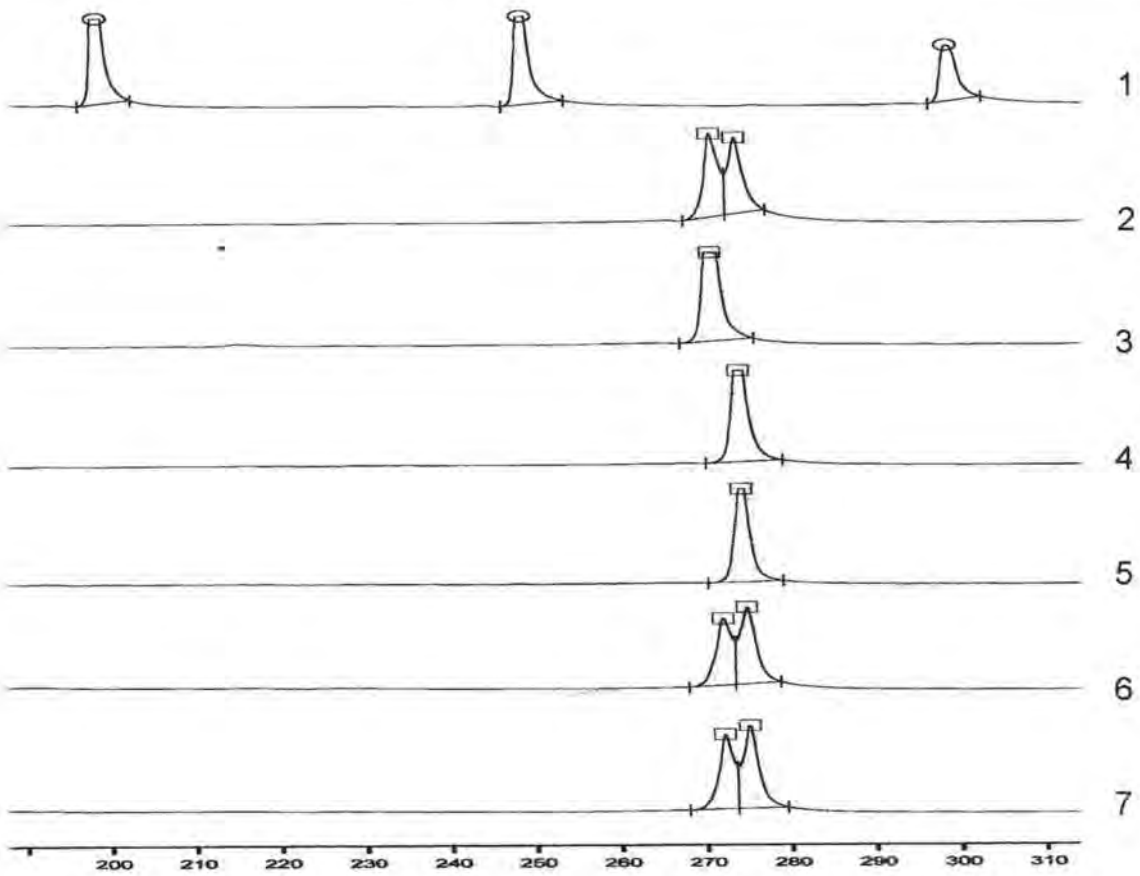


Fig. 10.4. Resultats de l'electroforesi en gel de poliacrilamida. Escala de tamany en parells de bases (pb).

Taula 10.1. Tamany dels pics de les línies 2 a la 7.

LÍNIA	NÚMERO DE PIC	TAMANY (pb)	AL·LEL
2	1	272,0	B
2	2	274,9	A
3	1	271,7	B
4	1	274,7	A
5	1	274,8	A
6	1	272,3	B
6	2	275,2	A
7	1	272,3	B
7	2	275,2	A

Els pics presents a la primera línia corresponen al marcador de tamany que va de 50 a 500 pb, així els tres pics que es veuen corresponen als tamany de 200, 250 i 300 bp.

El tamany de l'al·lel A és aproximadament de 275 bp i el de l'al·lel B de 272bp. El genotip que li correspondria a la mostra de les línies 2,6 i 7 seria el de heterozigot AB, a la de la línia 3 el d'homozigot BB i al de les línies 4 i 5 el d'homozigot AA.

### 10.5.3. POLIMORFISME GSTT1

El gen GSTT1 presenta dos al·lells: GSTT1\*1 (al·lel positiu) i GSTT\*0 (al·lel nul, delecció).

Oligonucleòtids (To-Figueras, et al., 1997):

- Oligonucleòtid 1: 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'
- Oligonucleòtid 2: 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'

El volum final de la **reacció de PCR** és de 25µl i conté 12ng d'ADN patró, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de KCl, 10mM de Tris( pH 9), 0,1% de tritó-X-100, 200µM de cada dNTP, BSA, 10pmols de cada oligonucleòtid i 0,625 unitats de Taq ADN polimerasa.

H <sub>2</sub> O	13,175µl
Tampó	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	2µl
dNTPs	2µl
BSA (1mg/ml)	2µl
Oligonucleòtid 1	1µl
Oligonucleòtid 2	1µl
Polimerasa	0,125µl
ADN patró	1,2µl



La reacció té lloc en 40 cicles (1 min a 94°C, 1 min a 62°C, 1 min 15 s a 72°C) amb una extensió final de 5 min. Es du a terme en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler. S'inclouen a la reacció un control positiu i un negatiu.

La **identificació** es realitza en electroforesi d'agarosa al 2%, el producte de la reacció té una longitud de 480pb. Si existeix una banda a 480pb és GSTT1 positiu, i si no apareix la banda és GSTT1 nul.

En la figura 10.5. es pot comprovar que només la mostra carregada en el pou número 2 és GSTT1 nul, la resta són GSTT1 positiu. En el pou número 10 hi ha un marcador de tamany de 100pb.



Fig. 10.5. Fotografia del gel d'agarosa dels resultats del polimorfisme GSTT1.

#### 10.5.4. POLIMORFISME GSTP1

La tècnica d'identificació del polimorfisme al codó 105 és PCR-RFLP (Harries et al., 1997). La transició A→G a l'exó 5 del gen GSTP1 dóna lloc a un canvi al codó 105 Ile→Val, i també dóna lloc a l'aparició d'una diana de restricció per l'enzim *A/w26/*. En el polimorfisme del codó 105 es poden diferenciar dos al·lels:

Al·lel GSTP1\*A (Ile<sup>105</sup>): no té la diana de restricció

Al·lel GSTP1\*B (Val<sup>105</sup>): sí té la diana de restricció

La **reacció de PCR** té un volum final de 20µl que conté 100ng d'ADN patró, 8 pmols de cada oligonucleòtid, 200µM de cada dNTP, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl (pH 8.3), 1,5 de MgCl<sub>2</sub> i 0,5 unitats de Taq ADN polimerasa (Ampli Taq Gold™ )

H <sub>2</sub> O	12,74µl
Tampó	2µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2µl
dNTPs	1,36µl
Oligonucleòtid 1	0,8µl
Oligonucleòtid 2	0,8µl
Polimerasa	0,1µl
ADN patró	1µl

Els oligonucleòtids van ser descrits per Harries et al. (Harries et al., 1997):

Oligonucleòtid 1: 5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3'

Oligonucleòtid 2: 5'-TGA GGG CAC AAG AAG CCC CT-3'

La reacció comença amb *hot start* (11min a 94°) seguit de 32 cicles (50s a 94°C, 50s a 54°C, 50s a 72°C) i última extensió de 5 min a 72°. S'afegeixen controls positiu i negatiu. Es realitza en Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler. El producte de la reacció té un tamany de 176 pb.

La **digestió** del producte de PCR es realitza prèvia purificació del mateix, amb l'enzim ***Aiw26I***, la diana de restricció del qual és:

5'-...GTCTC(N)1↓...3'; 3'...CAGAG(N)5↑

La reacció té un volum final de 15µl.

Tampó MBI <b><i>YTANGO</i></b> amb BSA	1,5 µl
Enzim <b><i>Aiw26I</i></b> (10u/µl) (MBI fermentas)	1µl
Producte de PCR	12.5µl

S'incuben les mostres per digerir O/N a 37°C (aproximadament 18 hores). També s'incuben controls GSTP1\*A /GSTP1\*A, GSTP1\*A /GSTP1\*B i GSTP1\*B /GSTP1\*B.

La **identificació del genotip** es du a terme mitjançant electroforesi submarina en gels d'agarosa Nusieve 3:1 FMC™ al 3% amb bromur d'etidi en funció del tamany de les bandes en cada pou, que corresponen al producte de PCR digerit amb l'enzim de restricció *Alw26I*. Així GSTP1\*A/GSTP1\*A presenta una única banda a 176 pb (pous 6 i 7 de la fig. 10.6); GSTP1\*A /GSTP1\*B presenten tres bandes a 176, 91 i 85 pb (pous 1, 2 i 3 de la fig. 10.6); i per últim GSTP1\*B/GSTP1\*B donaria lloc a dues bandes a 91 i 85 pb (pous 4 i 5 de la fig. 10.6).

Cal tenir en compte que les bandes a 85 i 91bp tenen tant poca diferència de tamany que en el gel de la fotografia no es poden apreciar i es veuen com una única banda. En els pous 8 i 17 estan els marcadors de tamany de 100pb.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

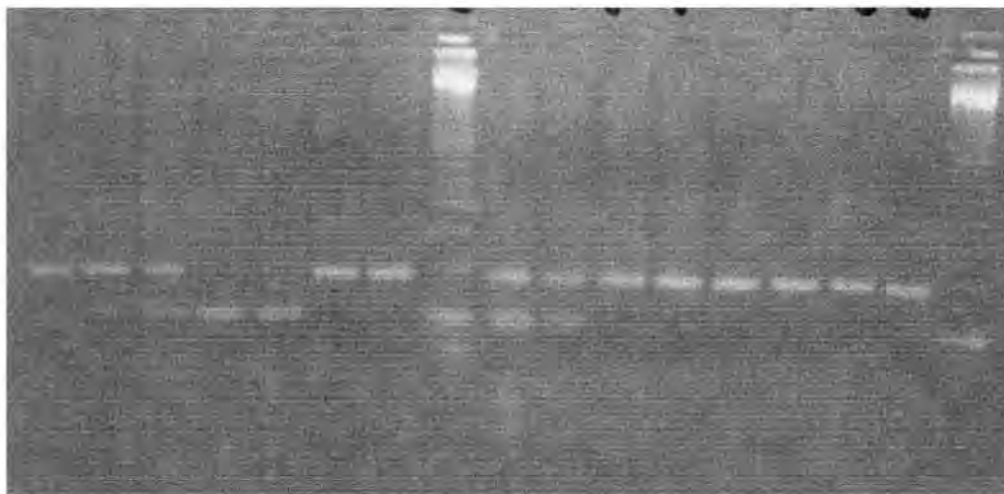


Fig. 10.6. Resultat del genotipat del polimorfisme *GSTP1*.

### 10.5.5. POLIMORFISME *EPHX1* exó 3

La mutació C→T a l'exó 3 dóna lloc a un canvi d'aminoàcid a la posició 113:

Tyr→His. Presenta dos al·lels:

- Al·lel salvatge (A)→Tyr 113
- Al·lel mutant (B)→His 113

Per detectar aquests al·lels es van fer servir dos mètodes diferents: PCR-RFLP i AS-PCR.

### 10.5.5.1. MÈTODE A: PCR-RFLP

Els oligonucleòtids que es van fer servir van ser descrits per Smith i Harrison (Smith & Harrison, 1997).

EPO 1: 5'- GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C-3'

EPO 2: 5'-ATC CTT AGT CTT GAA GTG AGG AT -3'

De fet en la seqüència del gen EPHX1 no existeix cap diana de restricció per l'enzim *EcoRV*, que serà l'enzim utilitzat en la digestió. L'oligonucleòtid 2 s'acaba justament en el lloc del polimorfisme, de manera que introduint un canvi de base en la seva seqüència es genera una diana de restricció només en el cas de l'al·lel A (wild-type, Tyr113).

La **reacció de PCR** té un volum final de 25µl que conté 150ng d'ADN patró, 200µM de cada dNTP, 15pmols de cada oligonucleòtid, 5% de DMSO, 50mM de KCl, 10mM de tris-HCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> i 0.625 unitats de taq ADN polimerasa (Ampli Taq Gold<sup>TM</sup>).

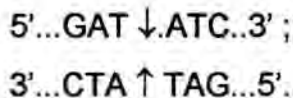
H <sub>2</sub> O	13,125µl
Tampó	2,5µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5µl
dNTPs	2µl
DMSO	1.25µl
EPO 1	1,5µl
EPO 2	1,5µl
Taq ADN polimerasa	0,125µl
ADN patró	1,5µl

Comença la reacció amb *hot start* 11 min a 94° i 5 cicles de temperatura: 1min a 94°C, 50s a 60°C (−1° cada cicle) i 1min a 72°C; seguits de 37 cicles: 55s a 94°, 50s a 55° i 1min 20s a 72°; finalitzant amb una extensió final de 5 min a 72°.

La reacció es va dur a terme en GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler amb un control negatiu i un positiu.

Per fer la **digestió** es va purificar el producte de PCR amb columnes Ultrafree®-MC Centrifugal (Millipore™).

L'enzim és l'**EcoRV** la diana de restricció del qual és:



La reacció de restricció amb un volum final de 12µl és la següent:

Tampó D Promega	1,2µl
BSA (1mg/ml)	1,2µl
Enzim <b>EcoRV</b> Promega (10 UI/µl)	1.5µl
Producte PCR purificat	8,1µl

S'incuben les mostres O/N a 37°C (aproximadament 18 hores). Juntament amb les mostres es digereixen un control AA, un control AB i un BB.

La **identificació del genotip** es du a terme mitjançant electroforesi submarina amb bromur d'etidi en gel d'agarosa, Nusieve3:1 FMC™ al 3%.

Els productes de la digestió (tant les mostres com els controls) corren paral·lelament a un marcador de tamany de 100pb. L'al·lel Tyr113 (al·lel A) presenta una diana de restricció per l'enzim *EcoRV*, l'al·lel His113 (al·lel B) no, per tant les bandes que s'observaran seran:

Homozigot Tyr113/Tyr113: 20 i 140 pb.

Heterozigot Tyr113/His113: 20, 140 i 162 pb

Homozigot His113/His113: 162pb



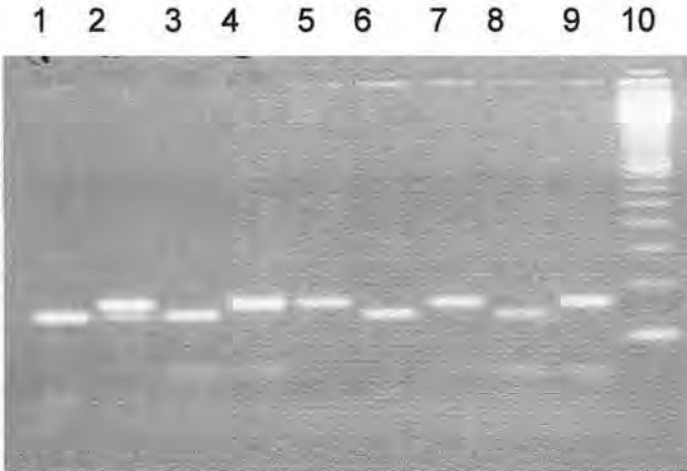


Fig. 10.7. Genotipat del polimorfisme EPHX1 ex3 pel mètode PCR-RFLP.

Si es fa la identificació de cadascuna de les mostres del gel de la fig. 10.7 la banda a 20pb no es pot identificar perquè queda emmascarada pels oligonucleòtids sobrants de la PCR, per tant la identificació es realitzarà amb la banda a 162 i la banda a 140bp. A la primera mostra li correspon un genotip AA, a la segona AB, al tercera AA i a la quarta BB. El pou número 10 té el marcador de tamany de 100pb.

#### 10.5.5.2. MÈTODE B: AS-PCR.

Els oligonucleòtids van ser descrits per Persson et al. (Persson et al., 1999) i són els següents:

Ex3F: 5'-TTT GCT CTT GTG CTC TGT-3'

Ex3RA: 5'-AGT CTT GAA GTG AGG GTG-3'

Ex3RB: 5'-AGT CTT GAA GTG AGG GTA-3'

Ex3RA i ex3RB són oligonucleòtids específics pels al·lels A i B respectivament, i es diferencien en la base terminal de la posició 3'.

La reacció de PCR per l'al·lel A té un volum final de 20 $\mu$ l que conté 120ng d'ADN patró, 10mM de Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), 50mM de KCl i 0.1% de tritóX-100, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 8 pmols de cada oligonucleòtid, 200 $\mu$ M de cada dNTP i 0,6 unitats de Taq ADN polimerasa.

H <sub>2</sub> O	12,3μl
Tampó	2μl
MgCl <sub>2</sub>	1,2μl
dNTPs	1,6μl
Ex3F	0,8μl
Ex3RA	0,8μl
Polimerasa	0,1μl
ADN patró	1,2μl

Les condicions de reacció de l'al·lel A són: 1min a 94°C→30 cicles de temperatura: 1min a 94°C, 1 min a 52°C i 1min 15s a 72°C.

La reacció de PCR per l'al·lel B també té un volum final de 20μl, té la mateixa composició que la reacció per l'al·lel A excepte el MgCl<sub>2</sub> que ara és 1.2mM.

H <sub>2</sub> O	12,94μl
Tampó	2μl
MgCl <sub>2</sub>	0,96μl
dNTPs	1,6μl
Ex3F	0,8μl
Ex3RB	0,8μl
Polimerasa	0,1μl
ADN patró	0,8μl

Les condicions de reacció d'amplificació de l'al·lel B són: 1min a 94°C→30 cicles de temperatura: 1min a 94°C, 1min a 56°C i 1min 15s a 72°C.

Ambdues reaccions es van dur a terme en un Perkin-Elmer GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler. Es van incloure controls positius i negatius.

La **identificació** es realitza en gel d'agarosa al 2%. El producte de les dues reaccions té el mateix tamany: 232pb. Es carreguen per parelles (dos pous per cada

mostra). Si existeix banda en el pou on s'ha carregat el producte de la reacció de PCR específica per l'al·lel A i no existeix banda en el pou on s'ha carregat el producte de la reacció de PCR específica per l'al·lel B a la mostra li correspon el genotip Tyr113/ Tyr113; si existeixen bandes a tots dos carrils el genotip és Tyr113/His113 i si només existeix banda en el carril B el genotip és His113/His113.

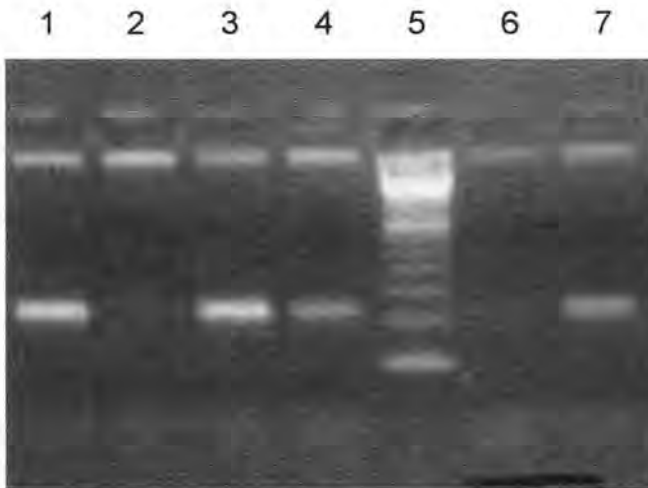


Fig. 10.8. Genotipat del polimorfisme EPHX1 exó3 pel mètode AS-PCR.

Els dos primers carrils del gel de la fig.10.8 corresponen a un genotip AA (només apareix banda en el carril A), els dos següents a un AB (apareix banda en els dos carrils), després ve el marcador de tamany de 100pb, i els dos carrils següents al marcador corresponen a un genotip BB (només apareix banda en el carril B).

### 10.5.6. POLIMORFISME EPHX1 exó4

La tècnica per estudiar aquest polimorfisme és PCR-RFLP.

La transició A→G dona lloc a un canvi d'aminoàcid en la posició 139, en l'exó 4, His→Arg. Aquesta mutació genera una diana de restricció per l'enzim *Rsa I*. Existeixen per tant dos al·lels.

- Al·lel A: His139
- Al·lel B: Arg139. Té la diana de restricció.

Oligonucleòtids descrits per Smith i Harrison (Smith & Harrison, 1997):

- EPO-3: 5'-ACA TCC ACT TCA TCC ACG T-3'

- EPO-4: 5'-ATG CCT CTG AGA AGC CAT-3'

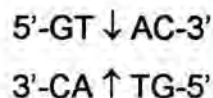
La reacció té un volum final de 20µl que conté 40ng d'ADN patró, 10mM de Tris-HCl (pH 9.0 a 25°C), 50mM de KCl i 0.1% de tritóX-100, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 12 pmols de cada oligonucleòtid, 5% de DMSO, 200µM de cada dNTP i 0,5 unitats de Taq ADN polimerasa.

H <sub>2</sub> O	11,3µl
Tampó	2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,2µl
dNTPs	1,6µl
DMSO	1 µl
EPO 3	1,2µl
EPO 4	1,2µl
Taq Polimerasa	0,1µl
ADN patró	0,4µl

Les condicions de la reacció són: 45s a 94°C →5 cicles de temperatura: 1min a 94°C, 50s a 60°C(-1° per cicle) i 1min a 72°C→37 cicles de temperatura: 55s a 94°, 50s a 55° i 1min 20s a 72°→extensió final de 7min a 72°.

Es va dur a terme en GeneAmp® PCR System 9700 Thermal Cycler. El producte de la reacció és de 210pb.

Després de purificar el producte de PCR es va **digerir** amb l'enzim **Rsa I** que té la següent diana de restricció:



La reacció de digestió té un volum final de 12µl

H <sub>2</sub> O	1,2µl
Tampó Y/TANGO (MBI Fermentas)	1,2µl
Enzim <b>Rsa I</b> (10u/µl) (MBI Fermentas)	1,5µl

Producte de PCR purificat

8,1 $\mu$ l

La **identificació** dels al·lels es realitza per electroforesi en gel d'agarosa al 3%, en funció del tamany del producte de PCR (210pb) digerit amb *RsaI*, només l'al·lel B presenta una diana de restricció per aquest enzim. A l'homozigot His139/His139 li correspon una banda a 210bp, a l'heterozigot His139/Arg139 tres bandes a 210, 164 i 46 pb, i per últim a l'homozigot Arg139/Arg139 dues bandes a 164 i 46 pb.

En la següent fotografia del gel d'agarosa (figura 10.9.) es pot observar que el primer pou correspon a un genotip AA, el segon pou a un AB i el tercer pou a un BB. En el pou número 10 es troba el marcador de tamany de 100bp.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



Fig. 10.9. Resultat de la digestió amb *Rsa I*.

## 11. MÈTODES D'ANÀLISI ESTADÍSTICA

Els càlculs estadístics s'han realitzat amb el programa Statgraphics Plus versió 5.0 per Windows®.

### 11.1. ESTUDI DE L'EQUILIBRI GENÈTIC

De l'anàlisi de les poblacions s'obtenen les freqüències genotípiques. Aquestes han d'estar en equilibri de Hardy-Weinberg. L'equilibri és conseqüència directa de la



segregació dels al·lells durant la meiosi dels heterozigots i es basa en la premissa de creuament aleatori. Quan es considera una població de gran tamany, en la que no operen ni la mutació ni la selecció, per un locus determinat, si els individus d'aquesta població es creuen entre si a l'atzar, el valor de les freqüències genotípiques es mantenen indefinidament de generació en generació i són les que s'esperen del creuament aleatori dels al·lells (Caeiro & Canabal, 1988; Griffiths et al. 1995).

Els genotips possibles pels gens GSTM3, GSTP1, EPHX1 exó 3 i EPHX1 exó 4 són (esquemàticament) AA, AB i BB. Pel gen GSTT1 existeixen dos genotips possibles: positiu o nul. Pel gen GSTM1 existeixen quatre genotips diferents: nul, positiu A, positiu AB i positiu B. Pels polimorfismes GSTM1 i GSTT1 no és possible el càlcul de l'equilibri de Hardy-Weinberg, ja que no se sap el nombre d'heterozigots.

A partir de les freqüències genotípiques observades es calculen les freqüències al·lèliques  $p$  (freqüència de l'al·lel A) i  $q$  (freqüència de l'al·lel B) (excepte pels gens GSTM1 i GSTT1). Es calculen ara les freqüències genotípiques absolutes teòriques (esperades):

$$AA = p^2n$$

$$AB = 2pqn$$

$$BB = q^2n$$

Sent  $n$  el nombre d'individus considerats a la mostra.

Es confronten les distribucions de les freqüències genotípiques observades (empíriques) i teòriques (esperades) per poder verificar la hipòtesi nul·la ( $H_0$ ) d'aparellament aleatori de la població. Aquest valor es quantifica mitjançant l'estadístic  $\chi^2$  (Sentis et al., 1995). Si  $p > 0,05$  s'accepta la hipòtesi nul·la i la població estudiada està en equilibri de Hardy-Weinberg ja que no existeixen diferències estadísticament significatives entre les freqüències observades i les que s'esperarien del creuament aleatori dels al·lells.

## 11.2. ESTUDI DEL DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

El desequilibri de lligament és l'associació preferencial o el lligament de gens o marcadors d'ADN en la població, per exemple la tendència d'alguns al·lels en un locus d'estar associats amb uns altres al·lels d'un altre locus però del mateix cromosoma amb freqüències majors que les que s'esperarien de l'atzar (Griffiths et al., 1995; Brennan, 1999; Garte et al., 1999).

De tots els gens polimòrfics estudiats GSTM3, GSTM1 i EPHX1 es troben en el mateix cromosoma, el cromosoma 1, per tant s'estudiarà el possible desequilibri de lligament entre els seus al·lels. Es combinaran els genotips de dos polimorfismes i s'estudiarà si són independents els uns dels altres mitjançant el test de la khi al quadrat. Si  $p < 0.05$  s'observa desequilibri de lligament entre els dos gens estudiats ja que existeixen diferències estadísticament significatives entre la combinació de freqüències observades i les esperades de l'atzar.

## 11.3. MESURES D'ASSOCIACIÓ

La hipòtesi que s'ha de confirmar és si la proporció d'individus amb un genotip concret és diferent en els casos que en els controls.

Es proposa una hipòtesi nul·la ( $H_0$ ): la proporció d'individus és la mateixa en els casos que en els controls, no existeixen diferències estadísticament significatives. La significació estadística ve donada pel test de la khi al quadrat ( $\chi^2$ ).

No indica la magnitud de l'efecte de posseir un genotip concret, només si les diferències observades són estadísticament significatives (Bolúmar, 2001).

### 11.3.1. ODDS RATIO

Els resultats d'un estudi epidemiològic de casos i controls es poden resumir en una taula de freqüències  $2 \times N$  en la que figurin el nombre de casos i controls per cadascun dels  $N$  valors de la variable independent (en el nostre cas, cadascun dels genotips possibles d'un determinat locus polimòrfic). La forma més simple d'analitzar els resultats per determinar si existeix risc associat a algun dels valors de la variable

dependent respecte a altre valor que es considera com categoria de referència és mitjançant el càlcul de la denominada "odds ratio" (OR).

	genotip		
	AA	AB	BB
casos	a	b	c
controls	d	e	f

"Odds ratio" (OR) del genotip AA respecte al genotip BB =  $a*f/c*d$

"Odds ratio" (OR) del genotip AB respecte al genotip BB =  $b*f/c*e$

"Odds ratio" (OR) dels genotip AA o AB respecte al genotip BB =  $(a+b)*f/c*(d+e)$

La "odds ratio" es pot considerar una mesura del risc relatiu; el seu valor indica el risc relatiu de contreure la malaltia en cas de tenir un genotip respecte al cas de tenir-ne un altre. Una OR (AA/BB) igual a 2 indica que el risc de càncer es doble en individus amb genotip AA respecte als individus amb genotip BB. Per comprovar que aquest resultat és estadísticament significatiu s'ha de calcular l'interval de confiança de l'OR per a un determinat nivell de significació. Es considera que l'OR indica risc significatiu si el valor 1 no està comprès en l'interval de confiança (Brennan, 1999).

Aquest mètode no permet corregir l'efecte d'altres variables que poden afectar al risc de contreure la malaltia. En el nostre cas, per exemple, es ben conegut que el tabaquisme es el principal factor de risc de càncer de pulmó; encara que s'ha seleccionat un grup control de fumadors amb un nivell de consum tabàquic raonablement similar al del grup de casos, la distribució de la variable tabaquisme (PY) no és idèntica en ambdós grups. El mateix podríem dir d'altres variables com edat, sexe o, fins i tot, la presència d'altres polimorfismes diferents al que s'està analitzant. Aquest tipus de problemes se solen tractar amb mètodes de regressió multivariant (Silva, 1995).

Es pot, en principi, proposar una regressió lineal, en que la variable depenent sigui dicotòmica (absència de malatia=0, presència de malatia=1):

$$\text{malaltia} = a + b(\text{genotip}) + c(\text{PY}) + e(\text{edat}) + \dots$$

Això no és possible matemàticament, perquè en una regressió la variable dependent no pot ser discreta sinó continua. Per a resoldre aquesta dificultat es defineix una variable:

$$\ln \frac{p}{1-p}$$

on  $p$  és la probabilitat d'aparició de la malaltia. Aquesta és una variable continua que pot assolir qualsevol valor i, per tant, s'utilitza com a variable dependent en el model de regressió:

$$\ln \frac{p}{1-p} = a + b(\text{genotip}) + c(\text{PY}) + e(\text{edat}) + \dots$$

Reordenant, s'obté:

$$p = \frac{1}{1 + e^{(-a - b(\text{genotip}) - c(\text{PY}) + e(\text{edat}) - \dots)}}$$

Aquest es el tipus d'equació que s'ajusta en el model de Regressió Logística i que permet modelar quantitativament la probabilitat de la malaltia en funció de diferents factors de risc. Evidentment, les variables independents categòriques com "genotip" s'han de recodificar prèviament a variables numèriques discretes: "1" pel genotip de risc i "0" pel genotip de referència.

Es pot demostrar que, si considerem únicament un factor de risc per exemple el genotip, l'odds ratio es pot expressar com:

$$\text{OR (genotip)} = \exp(b)$$

on "b" es el coeficient del genotip en la regressió. Anàlogament, si considerem un model multivariant,  $\exp(b)$  correspondrà a un valor de "odds ratio ajustada" que indicarà el risc relatiu associat al genotip, tenint en compte l'efecte de les altres variables.



## **V. RESULTATS**

## 12. ESTUDI DE FREQUÈNCIES

### 12.1. RESULTATS DEL POLIMORFISME GSTM1

El gen GSTM1 pot presentar en principi tres al·lels diferents: l'al·lel nul o GSTM1\*0 (delecció), l'al·lel positiu A o GSTM1\*A (lys<sup>173</sup>) i l'al·lel positiu B o GSTM1\*B (Asn<sup>173</sup>). Pel que fa als genotips possibles, el mètode emprat pel seu anàlisi no permet diferenciar entre GSTM1\*A/GSTM1\*0 i GSTM1\*A/GSTM1\*A ni entre GSTM1\*B/GSTM1\*0 i GSTM1\*B/GSTM1\*B, per tant es parlarà de genotip nul i genotip positiu, i entre els positius es diferenciarà entre positiu A, positiu AB i positiu B.

Els diagrames de barres següents mostren les freqüències absolutes dels genotips.

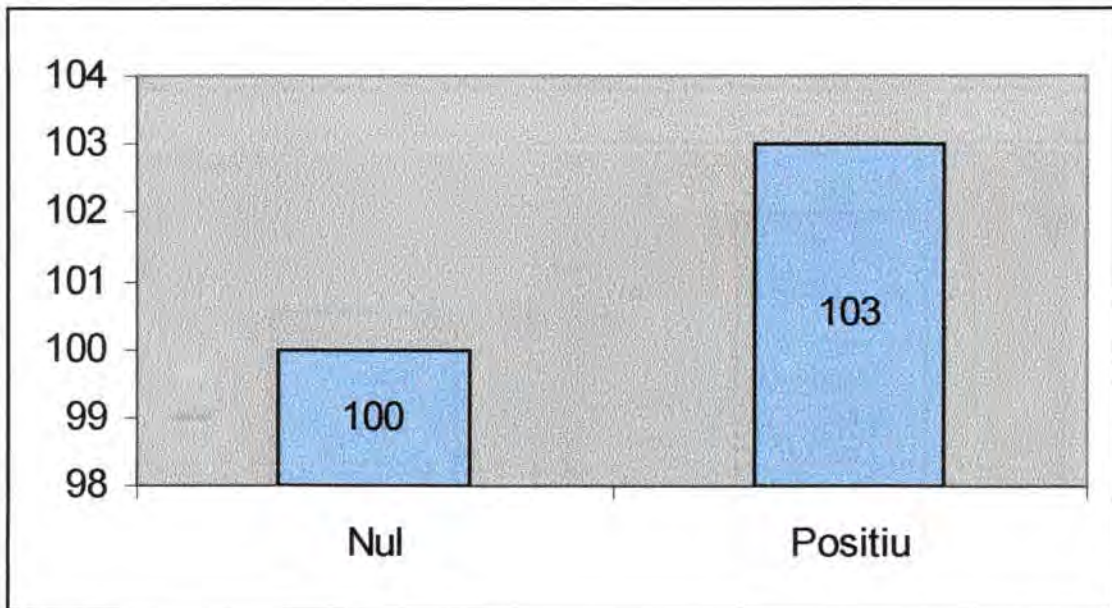


Fig. 12.1. Freqüències absolutes dels genotips positiu (positiu A+ positiu AB+ positiu B) i nul en el grup de fumadors control.

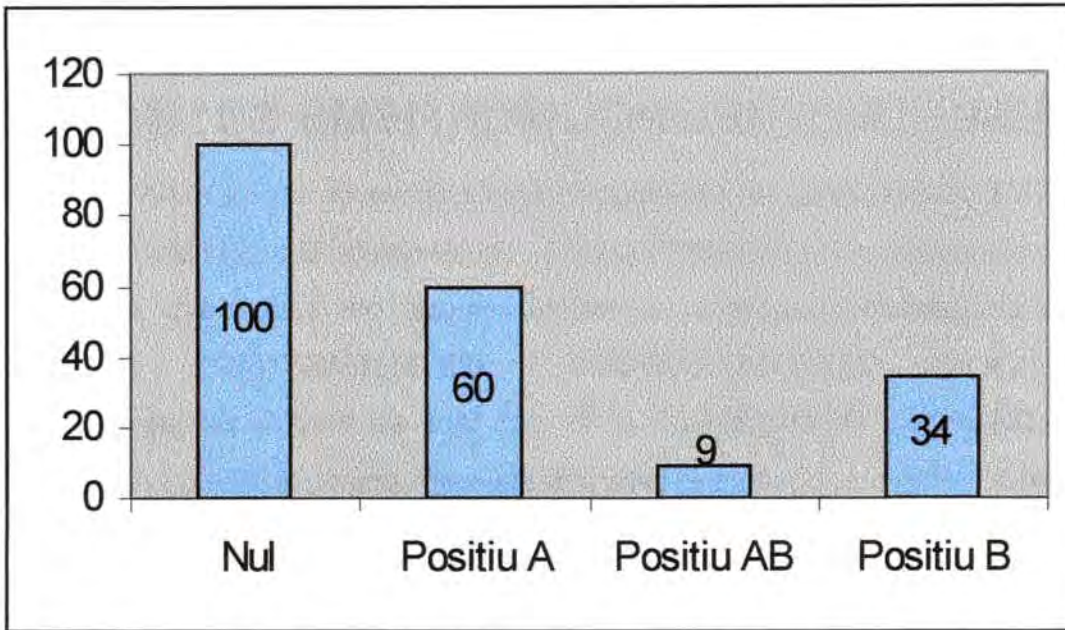


Fig. 12.2. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de fumadors control.

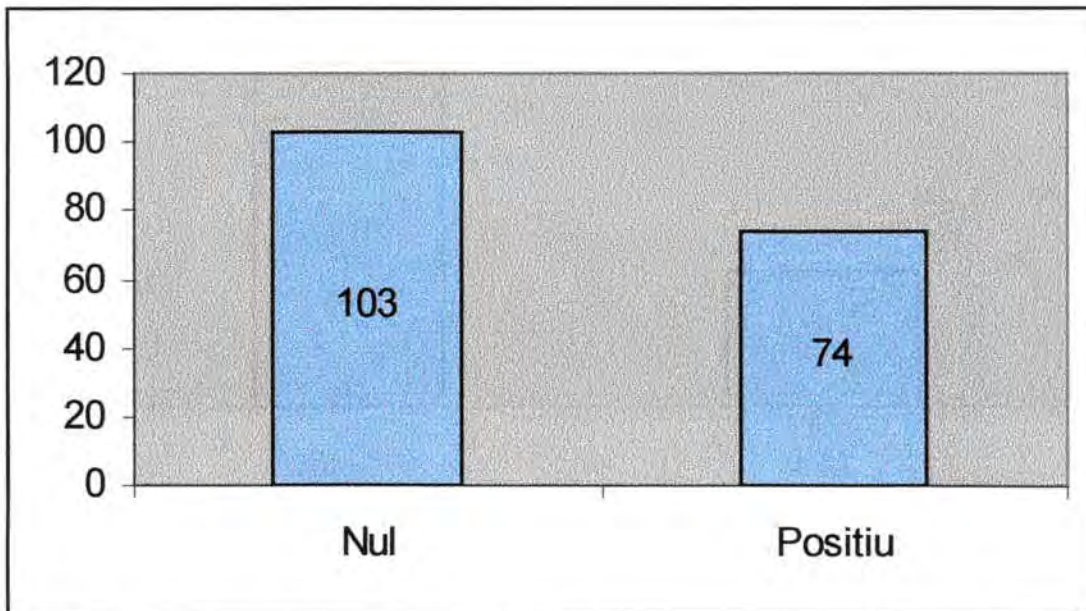


Fig. 12.3. Freqüències absolutes dels genotips positiu (positiu A+ positiu AB+ positiu B) i nul en el grup de malalts de càncer de pulmó.



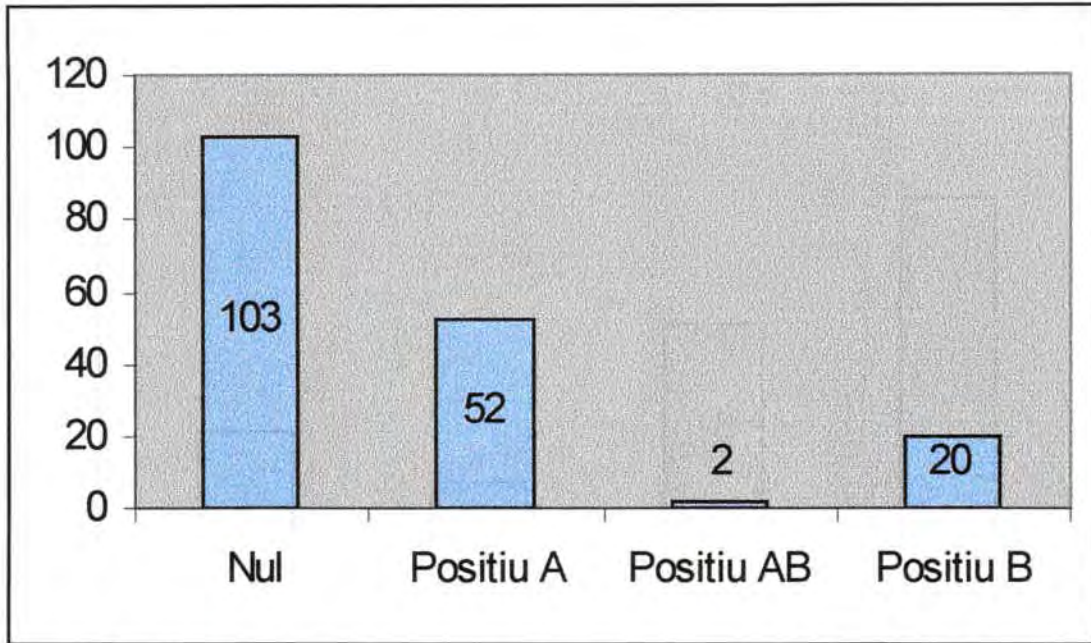


Fig. 12.4. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de pulmó.

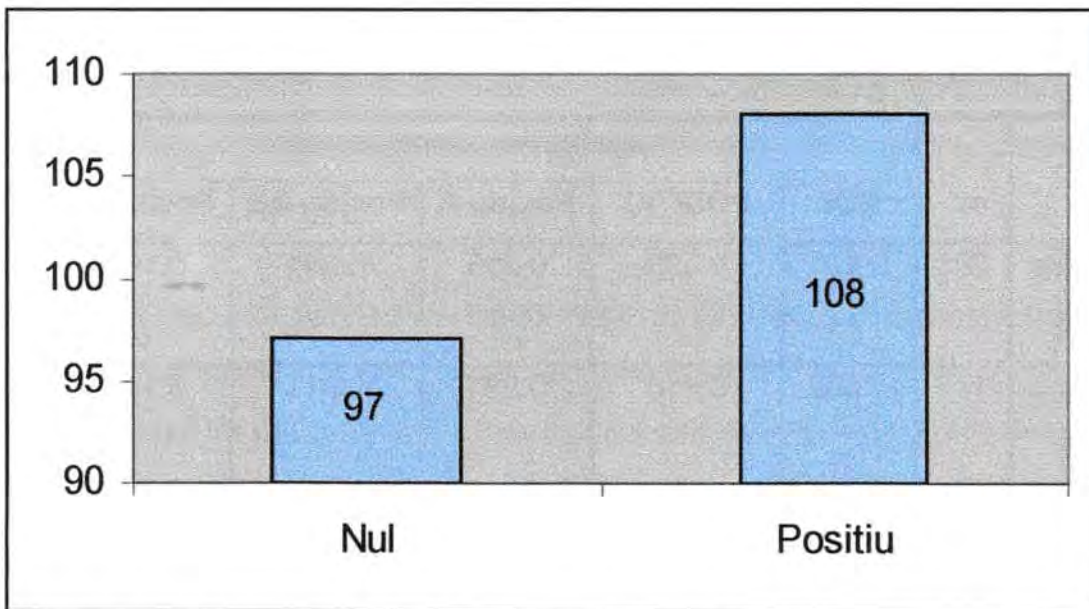


Fig. 12.5. Freqüències absolutes dels genotips positiu (positiu A+ positiu AB+ positiu B) i nul en el grup de malalts de càncer de laringe.

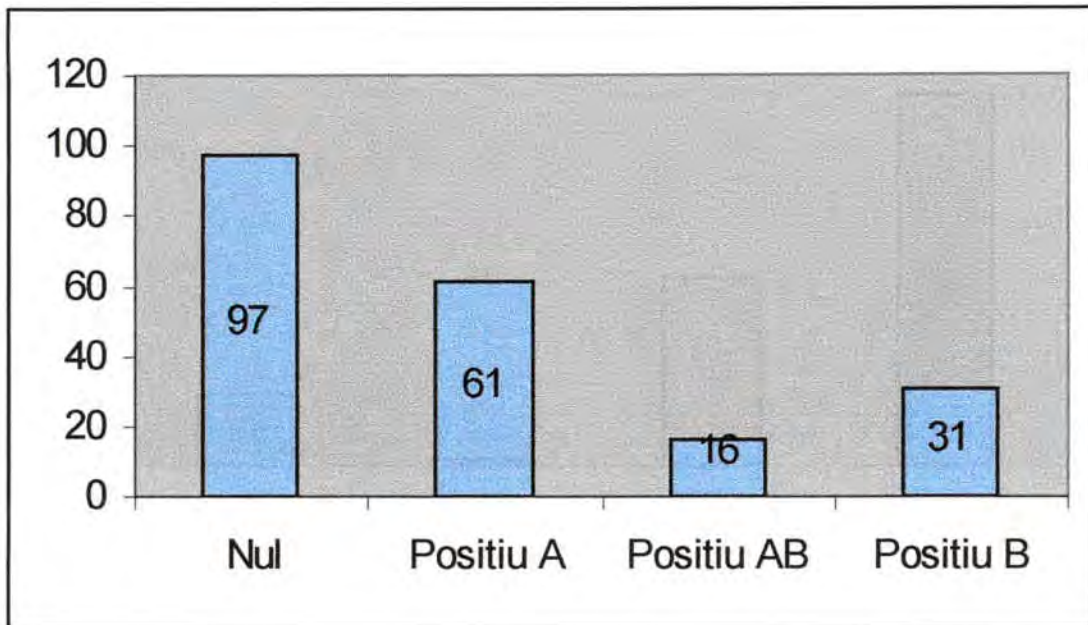


Fig. 12.6. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de laringe.

Taula 12.1. Freqüències relatives dels genotips del polimorfisme *GSTM1*.

	n <sup>a</sup>	Freqüències genotípiques				
		NUL	POSITIU	Positiu A	Positiu AB	Positiu B
<b>Fumadors</b>	203	0.492	0.508	0.296	0.044	0.167
<b>Control</b>						
<b>Càncer Pulmó</b>	177	0.582	0.418	0.294	0.011	0.113
<b>Càncer Laringe</b>	205	0.473	0.527	0.297	0.078	0.151

(a) Nombre d'individus estudiats



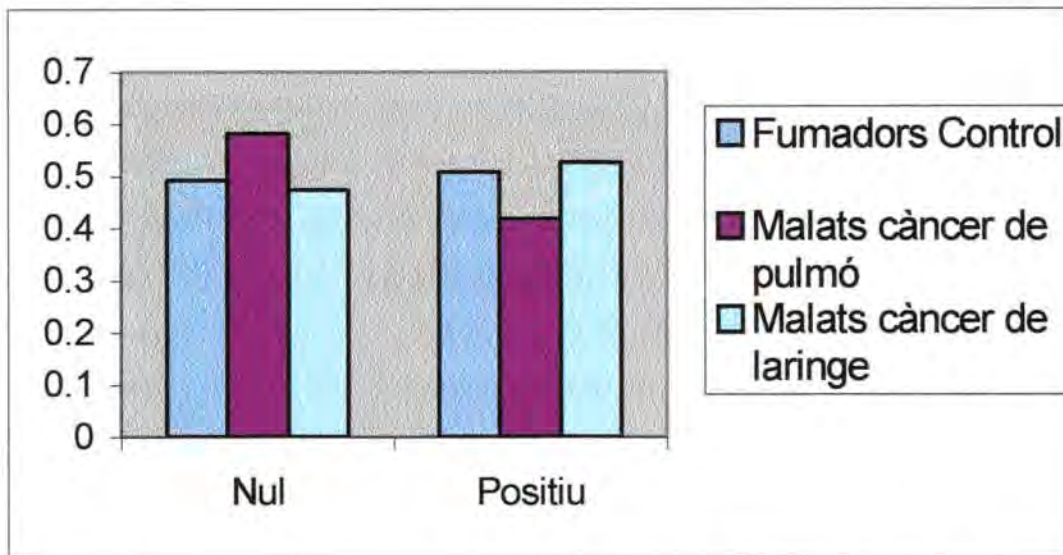


Fig. 12.7. Freqüències relatives dels genotips positiu (positiu A+ positiu AB+ positiu B) i nul en els diferents grups estudiats.

Dels tres grups estudiats els que tenen la freqüència més elevada del genotip nul són els malalts de càncer de pulmó, i el grup que la té menor són els malalts de càncer de laringe. S'observa també en el cas del subtipat dels positius, diferències considerables pel que fa a les freqüències del genotip AB entre els diferents grups analitzats. Posteriorment s'estudiarà si aquestes diferències són estadísticament significatives i si estan relacionades amb la susceptibilitat al càncer de pulmó o de laringe.

L'any 2001 ha sortit publicat un estudi realitzat pel GSEC (International Project on Genetic Susceptibility to Environmental Carcinogens) (Garte et al., 2001) a on es crea una base de dades amb les freqüències dels polimorfismes més estudiats dels gens que codifiquen per enzims implicats en el metabolisme dels carcinògens mediambientals. La freqüència del genotip nul en la població fumadora control del nostre estudi està d'acord, ja que no presenta diferències estadísticament significatives ( $P=0,280$ ), amb la publicada pel GSEC en població caucàsica que és de 53.1% amb un interval de freqüències entre els estudis que hi participen en el projecte del 42 al 60%.

La freqüència del genotip nul varia en funció de l'ètnia, en asiàtics (Garte et al., 2001) és de 52,9% ( $P=0,332$ , respecte a les nostres), i en africans (Garte et al., 2001) la freqüència és de 26,7% ( $P<0,001$ ), en la població mexicoamericana (Kelsey et al, 1997) és de 40,4% ( $P=0,101$ ), en afroamericans (London et al., 1995) és de 27,1% ( $P<0,001$ ) i en la població de l'Índia (Sreelekha et al., 2001) és de 33.0% ( $P=0,006$ ). S'observa que les nostres freqüències presenten diferències estadísticament significatives amb els africans, amb els afroamericans i amb la població de l'Índia; i no les presenta amb els mexicoamericans ni amb els asiàtics.

## 12.2. RESULTATS DEL POLIMORFISME GSTT1

El gen polimòrfic GSTT1 té dos possibles al·lells, GSTT1\*0 o al·lel nul i l'al·lel positiu o GSTT1\*1, que donen lloc a dos genotips diferents:

- genotip nul: GSTT1\*0/GSTT1\*0
- genotip positiu: GSTT1\*1/GSTT1\*0 o GSTT1\*1/GSTT1\*1

El mètode d'anàlisi genètic emprat no permet diferenciar si els positius són homozigots positius o bé si són heterozigots amb un al·lel nul.

Els diagrames de barres mostren les freqüències absolutes de cada genotip

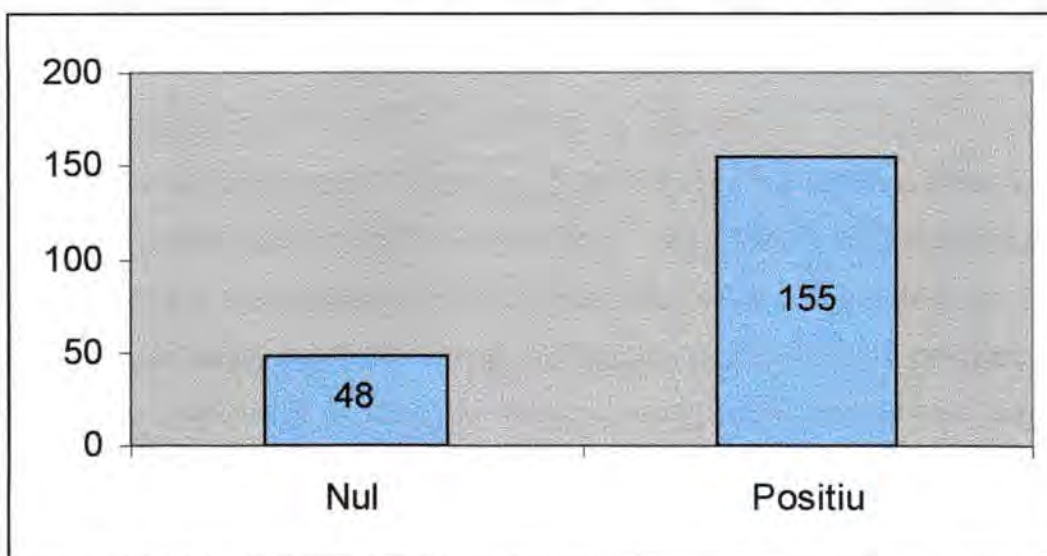


Fig. 12.8. Freqüències absolutes dels genotips nul i positiu en el grup de fumadors control.



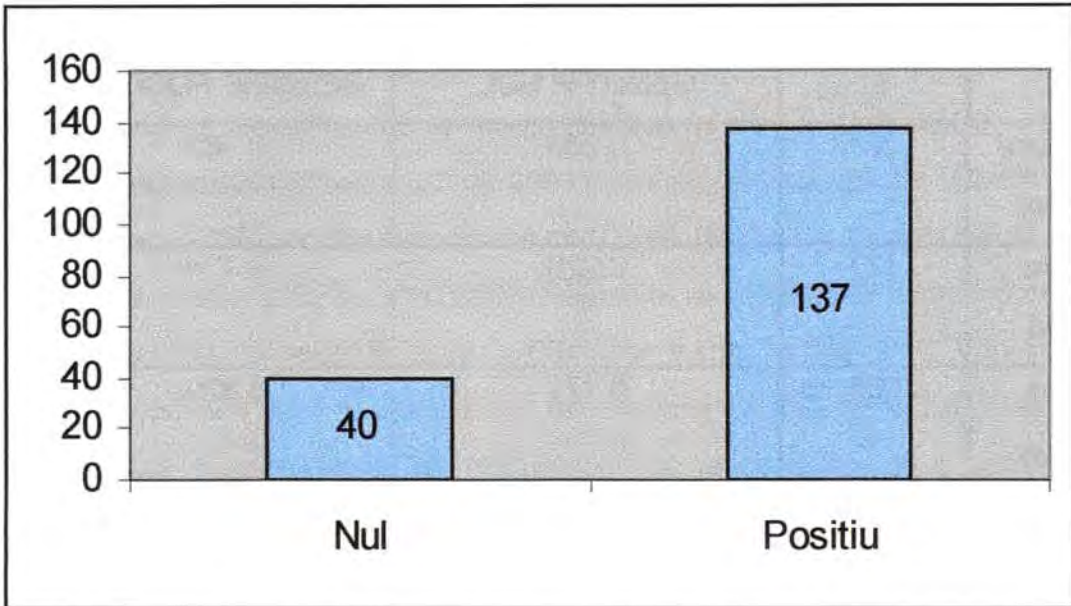


Fig. 12.9. Freqüències absolutes dels genotips nul i positiu en el grup de malalts de càncer de pulmó.

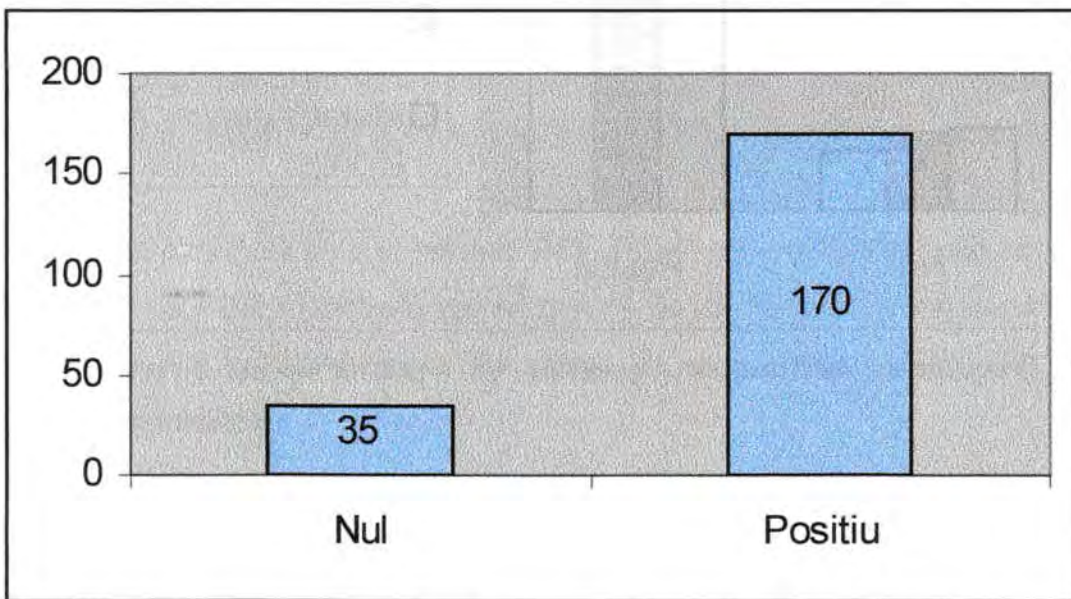


Fig. 12.10. Freqüències absolutes dels genotips nul i positiu en el grup de malalts de càncer de laringe.

Taula 12.2. Freqüències relatives dels genotips del polimorfisme GSTT1.

	n <sup>a</sup>	Freqüències genotípiques	
		GENOTIP NUL	GENOTIP POSITIU
<b>Fumadors Control</b>	203	0.236	0.763
<b>Càncer Pulmó</b>	177	0.226	0.774
<b>Càncer Laringe</b>	205	0.171	0.829

(a) Nombre d'individus estudiats.

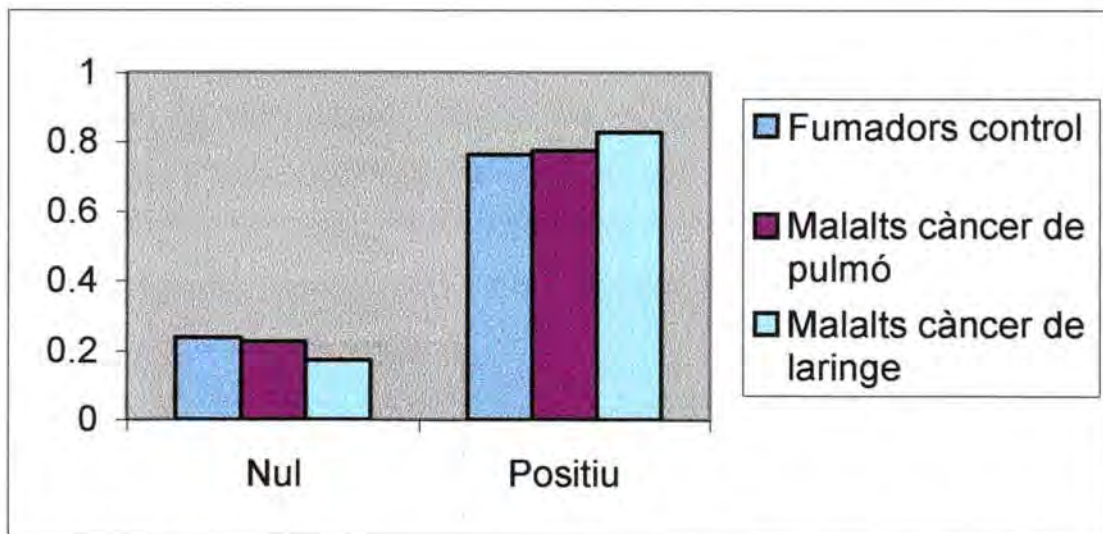


Fig. 12.11. Freqüències relatives dels genotips nul i positiu en els diferents grups estudiats.

S'observa que el grup de fumadors control és el que té una freqüència major del genotip nul, i el grup de malalts de càncer de laringe és el grup amb una major freqüència de genotip positiu. Les possibles implicacions d'aquestes diferències en relació a la susceptibilitat al càncer de pulmó i de laringe seran estudiades més endavant.

La nostra freqüència trobada en la població control del genotip nul està d'acord amb la publicada pel GSEC (Garte et al., 2001) que és de 19,7% amb un interval de 13 a 26% ( $P=0,167$ , respecte les nostres freqüències). També la freqüència d'aquest genotip varia en funció de l'ètnia així en asiàtics és de 47,0% ( $P<0,001$ , respecte les nostres freqüències) (Garte et al., 2001); en japonesos és de 44,4% ( $P<0,001$ ) (Kato et al., 1996); en afroamericans de 21,8% ( $P=0,710$ ) (Nelson et al., 1995); en mexicoamericans de 9,7% ( $P=0,009$ ) (Nelson et al., 1995); en població de l'Índia de 8,0% ( $P=0,001$ ) (Sreelekha et al., 2001); en turcs 20,0% ( $P=0,353$ ) (Oke et al., 1998); en xinesos 64,4% ( $P<0,001$ ) i en coreans 60,2% ( $P<0,001$ ) (Nelson et al., 1995). Totes elles, excepte les freqüències de la població turca i afroamericana, presenten diferències estadísticament significatives amb les de la nostra població caucàsica.

### 12.3. RESULTATS DEL POLIMORFISME GSTM3

El gen polimòrfic GSTM3 presenta dos possibles al·lels en funció d'una delecció de 3pb a l'intró 6 del gen, GSTM3\*A (no té la delecció) i GSTM3\*B (té la delecció). Es farà referència a l'al·lel GSTM3\*A com l'al·lel A i a GSTM3\*B com l'al·lel B, per tant existiran tres genotips que seran AA, AB i BB els quals equivaldran a GSTM3\*A/GSTM3\*A, GSTM3\*A/GSTM3\*B i GSTM3\*B/GSTM3\*B respectivament.

El resultat obtinguts amb el mètode PCR-RFLP són equivalents als obtinguts amb el mètode de PCR i electroforesi en gel de poliacrilamida. S'han estudiat tots els grups pels dos mètodes per tal de validar el segon mètode i no s'ha trobat cap resultat contradictori.

A continuació els diagrames de barres representen les freqüències absolutes de cada genotip en els tres grups estudiats:



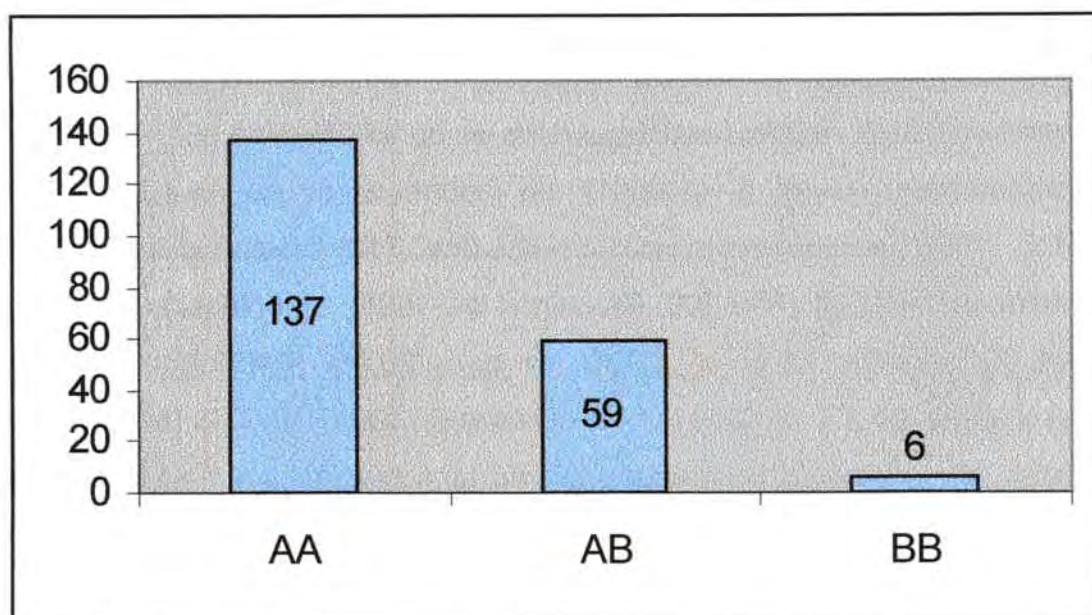


Fig. 12.12. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de fumadors control.

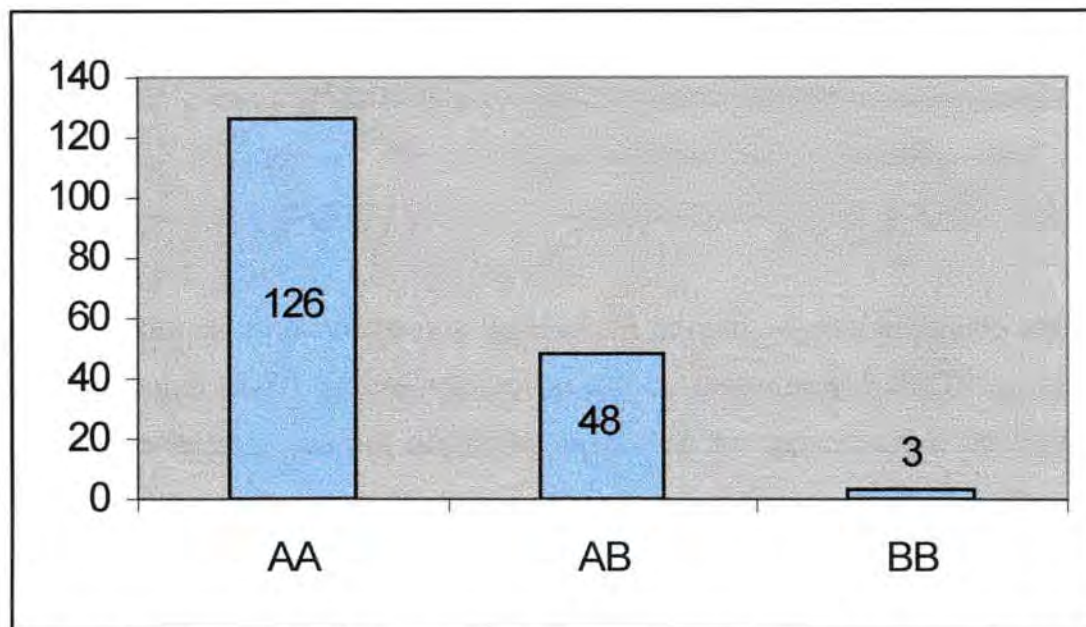


Fig. 12.13. Freqüències absolutes dels genotips en el grup dels malalts de càncer de pulmó.

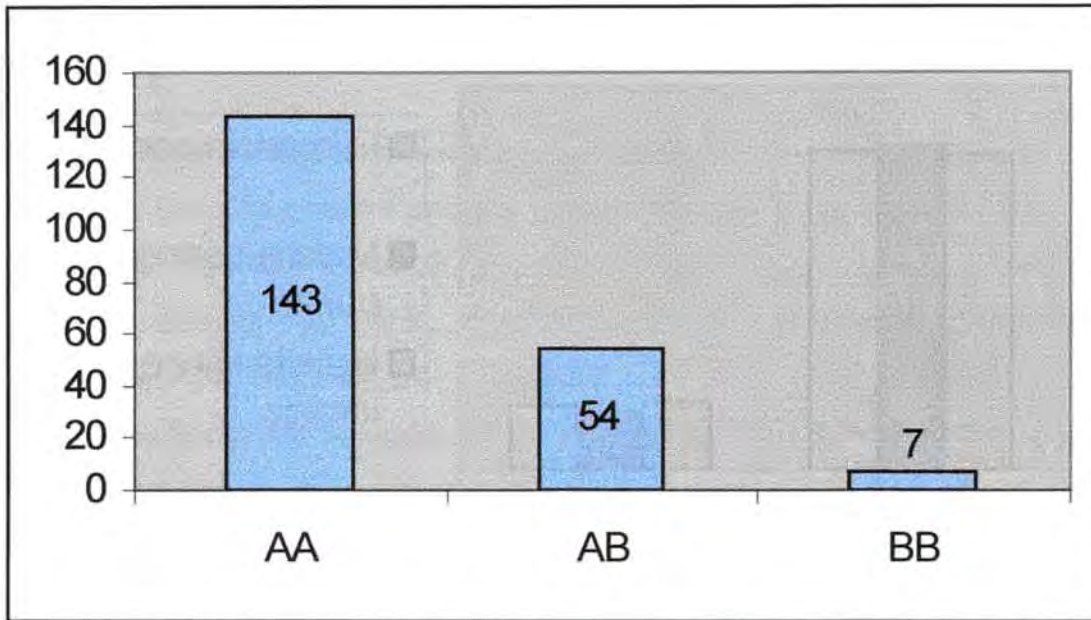


Fig. 12.14. Freqüències absolutes dels genotips en el grup dels malalts de càncer de laringe.

Taula 12.3. Freqüències relatives del polimorfisme *GSTM3*.

	n <sup>a</sup>	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques	
		AA	AB	BB	A	B
<b>Fumadors</b>	202	0.678	0.292	0.030	0.824	0.176
<b>Control</b>						
<b>Càncer Pulmó</b>	177	0.712	0.271	0.017	0.848	0.152
<b>Càncer Laringe</b>	204	0.700	0.265	0.035	0.833	0.167

(a) Nombre d'individus estudiats

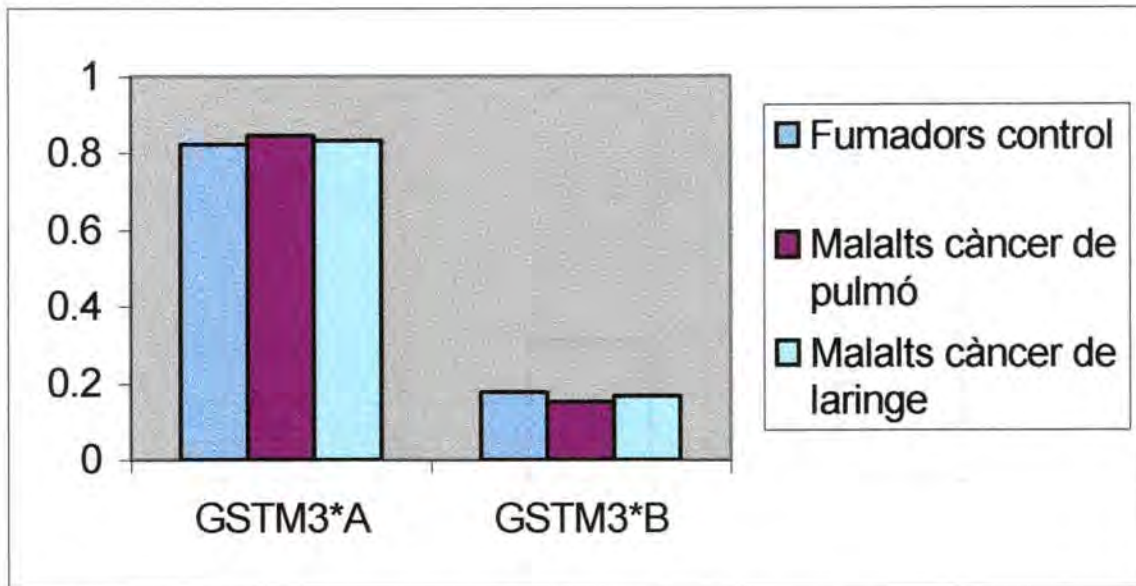


Fig. 12.15. Freqüències al·lèliques en els diferents grups estudiats.

S'observa que la freqüència de l'al·lel GSTM3\*B és més elevada en els controls que en els dos grups de casos. Per altre banda, el grup que presenta una freqüència més elevada de l'al·lel GSTM3\*A són els malalts de càncer de pulmó. S'estudiaran més endavant aquestes diferències en relació al risc de càncer de pulmó i de laringe.

En estudiar l'equilibri de Hardy-Weinberg en la població control s'obtenen els següents resultats (taula 12.4.):

Taula 12.4. Resultats de l'equilibri de Hardy-Weinberg

	Freqüències observades			Freqüències esperades			$\chi^2$	P
	AA	AB	BB	AA	AB	BB		
<b>Fumadors Control</b>	137	59	6	137.1	58.6	6.3	0.017	>0.05



En obtenir un valor de P superior a 0,05 es pot afirmar que la població control estudiada es troba en equilibri de Hardy-Weinberg.

Les freqüències del polimorfisme del gen GSTM3 no han estat publicades encara pel GSEC. Les de la nostra població control estan d'acord amb les publicades per Inskip et al.: AA 70,9%. AB 25,8% i BB 3,4% (P=0,723); amb les publicades per Hand et al. que són AA 73,7%, AB 21,3% i BB 5,0% (P=0,089); amb les publicades per Jahnke et al. AA% 66,5%, AB 27,5% i BB 6,5% (P=0,294); i també amb les publicades per Jourenkova-Mironova et al.: AA 72,7%, AB 24,4% i BB 2,9% (P=0,576). Totes elles en població caucàsica. (Inskip et al., 1995; Hand et al., 1996; Jahnke et al., 1996; Jourenkova-Mironova et al., 1999)

## 12.4. RESULTATS DEL POLIMORFISME GSTP1

El gen GSTP1 pot presentar dos al·lells en funció d'una transició A→G a l'exó 5 que implicarà un canvi d'aminoàcid a la posició 105 de la proteïna: GSTP1\*A (al·lel A) Ile<sup>105</sup> i GSTP1\*B (al·lel B) Val<sup>105</sup>. Aquests dos al·lells donen lloc a tres genotips diferents: GSTP1\*A/GSTP1\*A o genotip AA, GSTP1\*A/GSTP1\*B o genotip AB i GSTP1\*B/GSTP1\*B o genotip BB.

Els següents diagrames de barres representen les freqüències absolutes de cada genotip en els diferents grups estudiats:

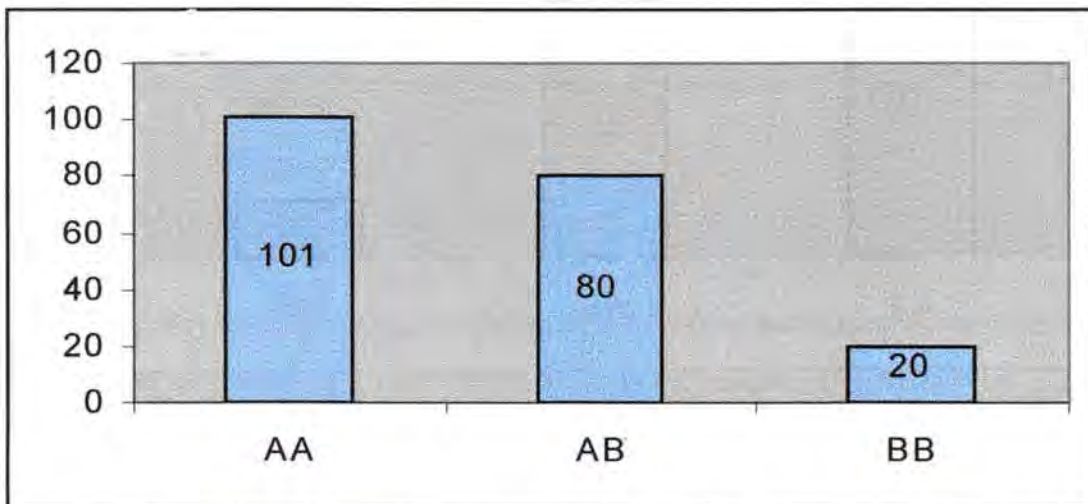


Fig. 12.16. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de fumadors control.

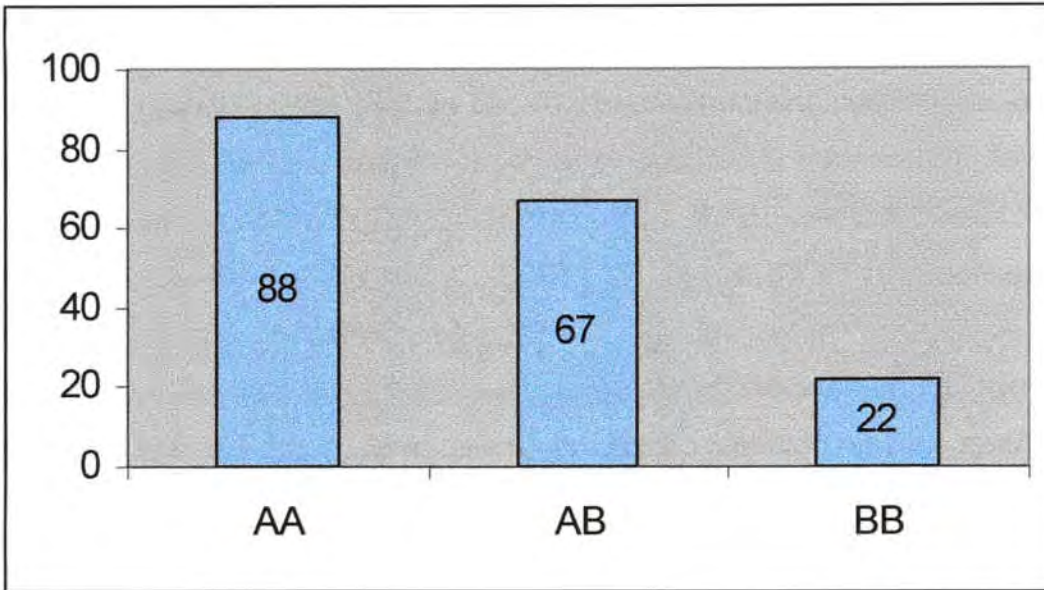


Fig. 12.17. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de pulmó.

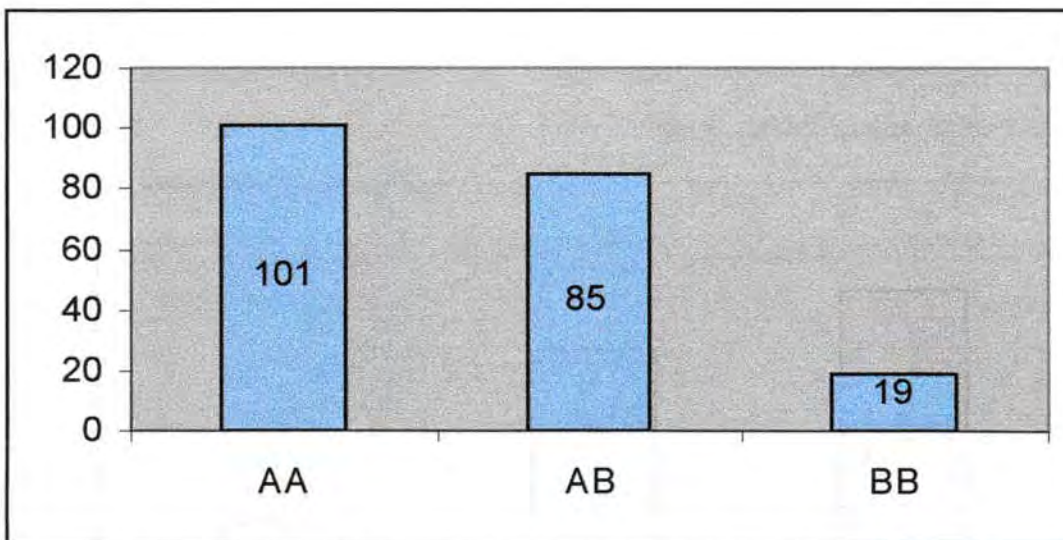


Fig. 12.18. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de laringe.



Taula 12.5. Freqüències relatives del polimorfisme GSTP1.

	n <sup>a</sup>	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques	
		AA	AB	BB	A	B
<b>Fumadors Control</b>	201	0.502	0.398	0.100	0.701	0.299
<b>Càncer Pulmó</b>	177	0.497	0.378	0.124	0.686	0.313
<b>Càncer Laringe</b>	205	0.493	0.415	0.093	0.700	0.300

(a) Nombre d'individus estudiats.

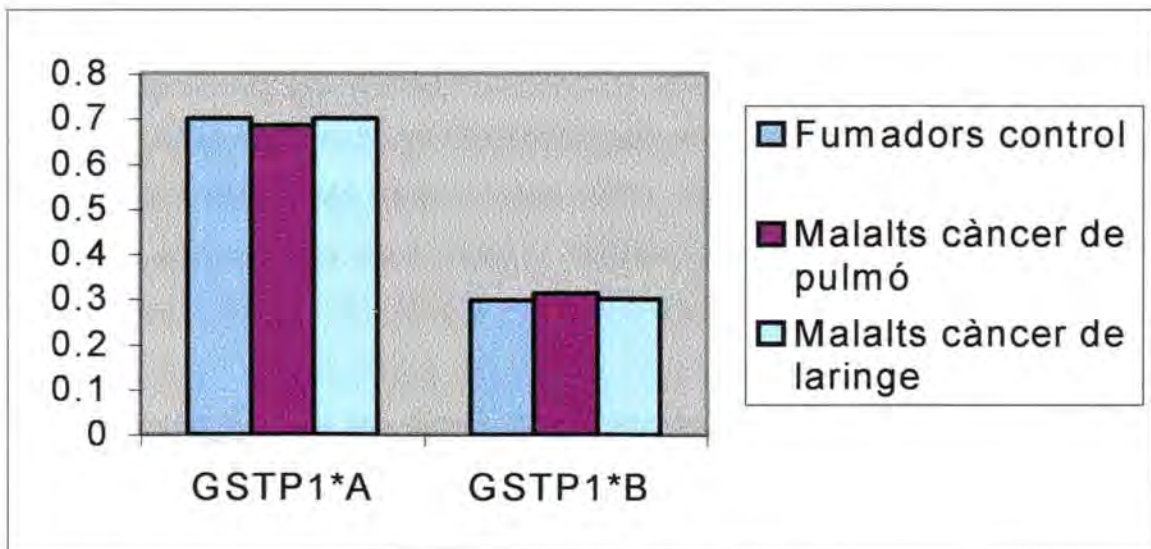


Fig. 12.19. Freqüències al·lèliques en els diferents grups estudiats.

La freqüència més elevada de l'al·lel GSTP1\*A correspon als fumadors control, mentre que la més baixa correspon al grup de malalts de càncer de pulmó. Més endavant s'estudiaran les OR associades a aquestes freqüències i si presenten diferències estadísticament significatives.

L'estudi de l'equilibri de Hardy-Weinberg en la població control dóna el resultat següent (taula 12.6.).

Taula 12.6. Resultats de l'equilibri de Hardy-Weinberg.

	Freqüències observades			Freqüències esperades			$\chi^2$	P
	AA	AB	BB	AA	AB	BB		
<b>Fumadors</b>	101	80	20	98.8	84.2	18.0	0.480	>0.05
<b>Control</b>								

La P és major de 0,05 per tant la població control estudiada es troba en equilibri de Hardy-Weinberg.

Les nostres freqüències en la població control per aquest polimorfisme estan d'acord amb les publicades en la població noruega (Ryberg et al., 1997): AA 51,5%, AB 39,4% i BB 9,1% (P=0,93); així com també estan d'acord amb les publicades en la població escocesa (Harries et al., 1997) AA 51,0%, AB 42,5% i BB 6,5% (P=0,485); i amb les publicades per Jourenkova-Mironova et al. en la població caucàsica que són: AA 50,0%, AB 37,2% i BB 12,8% (P=0,661) (Jourenkova-Mironova et al., 1999).

Les freqüències d'aquest polimorfisme varien en funció de les poblacions i dels diferents grups ètnics, així en la població afroamericana les freqüències són les següents: AA 35,0%, AB 46,0% i BB 19,0%; i en canvi en taiwanesos són; AA 67,0%, AB 30,0% i BB 3,0% (Watson et al., 1998). Ambdues poblacions presenten diferències estadísticament significatives en les seves freqüències respecte a les de la nostra població control amb uns valors de P igual a 0,007 i 0,003 respectivament. També en el mateix treball (Watson et al., 1998) es publiquen les freqüències d'aquest polimorfisme en població americana d'origen europeu: AA 42%, AB 51% i BB 7%, les quals també presenten diferències estadísticament significatives amb les trobades pel nostre grup, P=0,042.

## 12.5. RESULTATS DEL POLIMORFISME EPHX1 EXÓ3

El gen EPHX1 a l'exó 3 presenta un polimorfisme que dóna lloc a dos possibles al·lels en funció de la variació d'un aminoàcid al codó 113 de la proteïna: Tyr113 (al·lel A) i His113 (al·lel B). Per tant es farà referència al genotip Tyr113/Tyr113 com a AA, a Tyr113/His113 com a genotip AB i a His113/His113 com a genotip BB.

Aquest polimorfisme va ser estudiat per dos mètodes diferents. El primer mètode que es va emprar va ser el mètode A (PCR-RFLP), es van estudiar el grup de fumadors control i el grup de malalts de càncer de pulmó. Les freqüències obtingudes en el grup de fumadors control no estaven en equilibri de Hardy-Weinberg i per tal de confirmar aquests resultats es va estudiar una segona població control, la població general, que continuava sense estar en equilibri. Es va tornar a fer l'estudi d'aquest polimorfisme amb un mètode diferent, el mètode B (AS-PCR), i els resultats van ser satisfactoris donat que les dues poblacions control estudiades, tant els fumadors com la població general, estaven en equilibri genètic. El grup de malalts de càncer de laringe en ser l'últim grup estudiat només va ser analitzat pel mètode B (Smith & Harrison, 1997; Persson et al., 1999).

Les característiques de la població general estudiada com a segon grup control són les següents: 126 individus catalans procedents del banc de sang de l'Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, mostra recollida durant els anys 1997-1999. Són caucàsics nascuts tots a Espanya i amb domicili a l'àrea metropolitana de Barcelona. La mitjana de l'edat és  $43 \pm 10$  anys, amb un interval comprès entre 26 i 77 anys. Pel que fa al sexe hi ha 99 homes i 27 dones. No tenen cap relació de parentesc entre ells. L'hàbit tabàquic i l'exposició laboral a altres carcinògens són factors desconeguts.

La representació gràfica de les freqüències absolutes obtingudes pels dos mètodes emprats (PCR-RFLP i AS-PCR) es mostra en les figures següents:



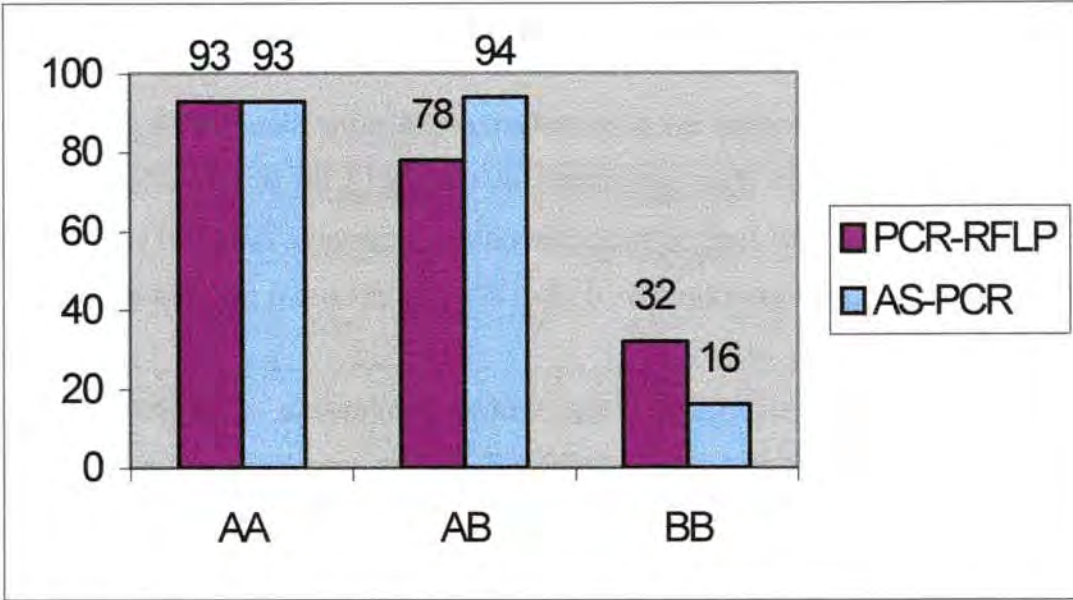


Fig. 12.20. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de fumadors control.

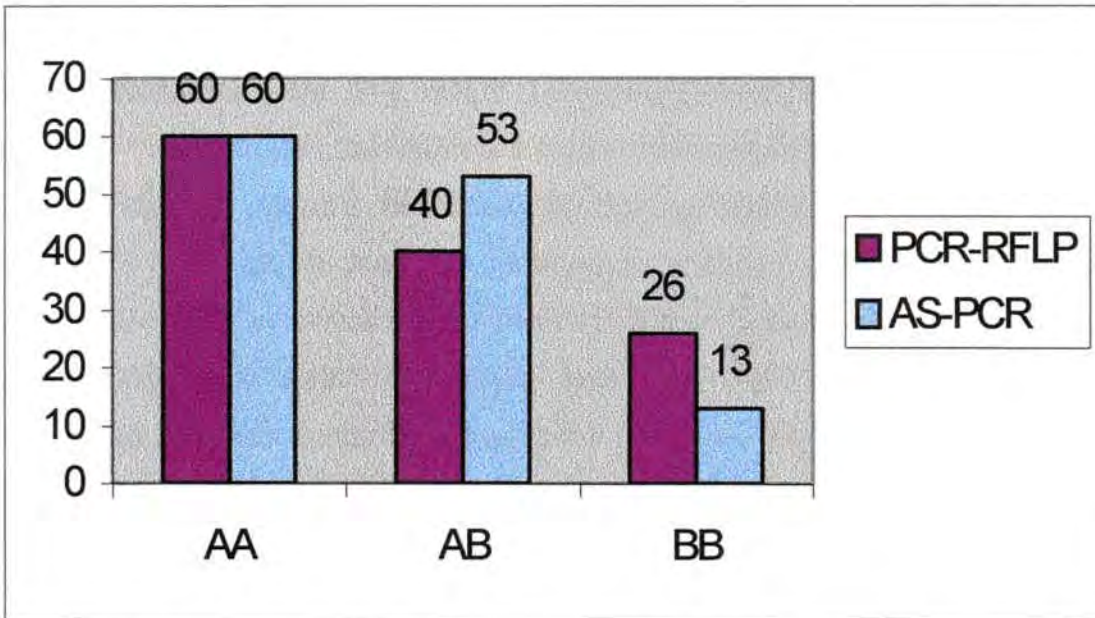


Fig. 12.21. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de població general.

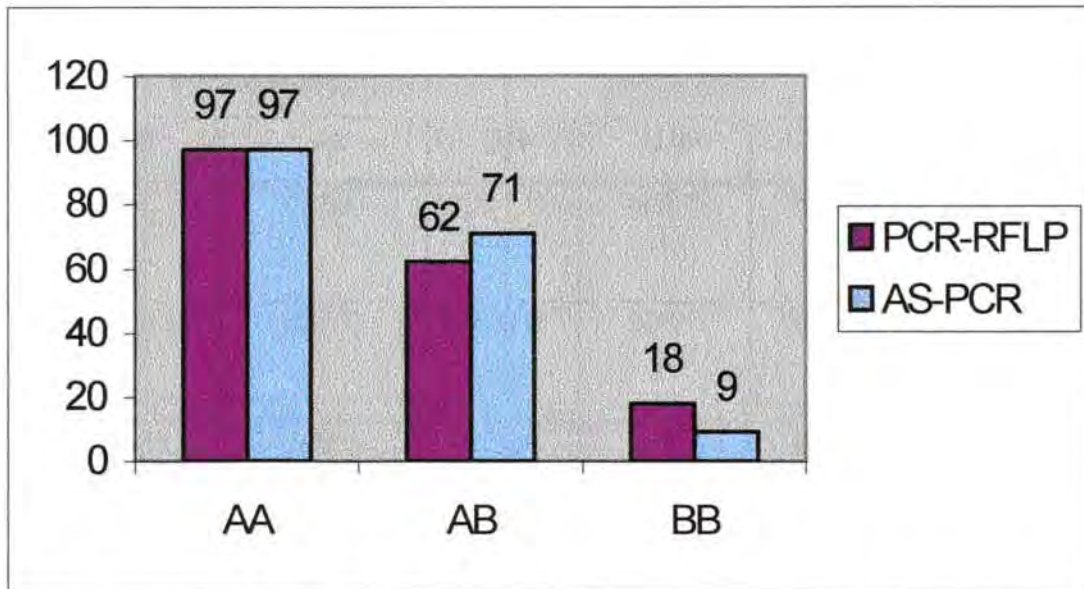


Fig. 12.22. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de pulmó.

S'observen clarament les diferències entre les freqüències absolutes obtingudes pels dos mètodes.

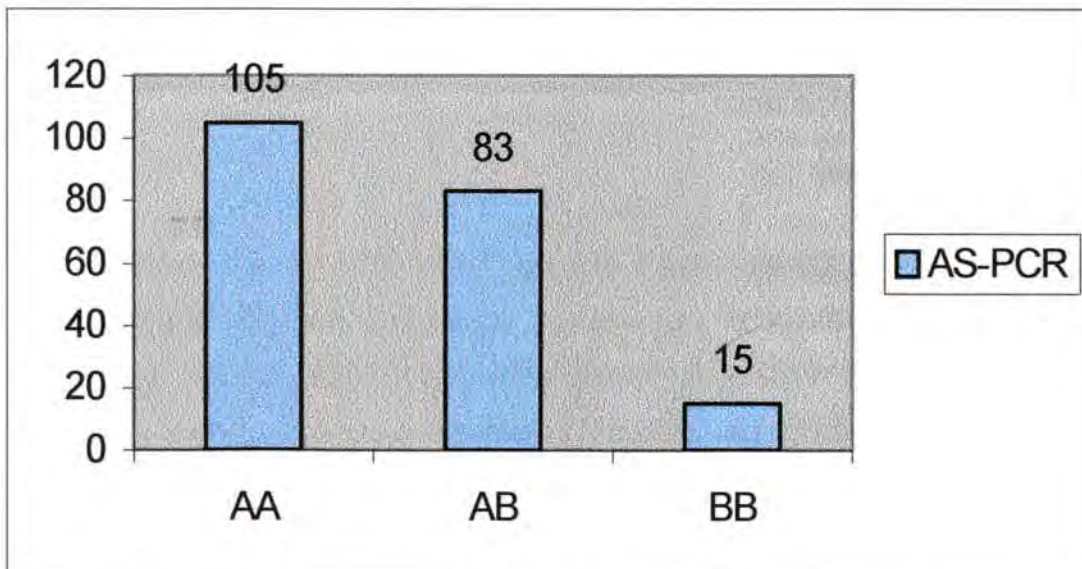


Fig. 12.23. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de laringe.



Taula 12.7. Freqüències relatives del polimorfisme EPHX1 exó3.

	n <sup>c</sup>	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques	
		AA	AB	BB	A	B
<b>Fumadors Control<sup>a</sup></b>	203	0.458	0.384	0.158	0.650	0.350
<b>Fumadors Control<sup>b</sup></b>	203	0.458	0.463	0.079	0.689	0.311
<b>Població General<sup>a</sup></b>	126	0.476	0.317	0.206	0.635	0.365
<b>Població General<sup>b</sup></b>	126	0.476	0.421	0.103	0.686	0.314
<b>Càncer Pulmó<sup>a</sup></b>	177	0.548	0.350	0.102	0.723	0.277
<b>Càncer Pulmó<sup>b</sup></b>	177	0.548	0.401	0.051	0.748	0.252
<b>Càncer Laringe<sup>b</sup></b>	203	0.517	0.409	0.074	0.721	0.279

(a) Grup estudiat pel mètode PCR-RFLP.

(b) Grup estudiat pel mètode AS-PCR.

(c) Nombre d'individus estudiats.

Les freqüències del genotip homozigot AA (Tyr113/Tyr113) són les mateixes en els dos mètodes amb els que s'ha estudiat les poblacions però les freqüències de l'hererozigot (Tyr113/His113) i de l'homozigot BB (His113/His113) són diferents. De fet si s'estudia la població pel mètode A s'observa un augment de genotips homozigots mutants (el doble) i una disminució d'heterozigots respecte l'estudi de les poblacions pel mètode B.

L'estudi de l'equilibri de Hardy-Weinberg en les poblacions control amb les freqüències obtingudes pels dos mètodes dona els resultats següents (taula 12.8.):

Taula 12.8. Resultats de l'equilibri de Hardy-Weinberg.

	Freqüències observades			Freqüències esperades			$\chi^2$	P
	AA	AB	BB	AA	AB	BB		
Fumadors Control <sup>a</sup>	93	78	32	85.8	92.4	24.9	4.87	<0.05
Fumadors Control <sup>b</sup>	93	94	16	96.4	87.0	19.6	1.34	>0.05
Població General <sup>a</sup>	60	40	26	50.8	58.4	16.8	12.49	<0.05
Població General <sup>b</sup>	60	53	13	59.3	54.3	12.4	0.068	>0.05

(a) Grup estudiat pel mètode PCR-RFLP.

(b) Grup estudiat pel mètode AS-PCR.

S'observa que les poblacions control estudiades pel mètode PCR-RFLP no es troben en equilibri Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ), en canvi si s'estudien pel mètode AS-PCR sí que es troben en equilibri ( $P > 0,05$ ).

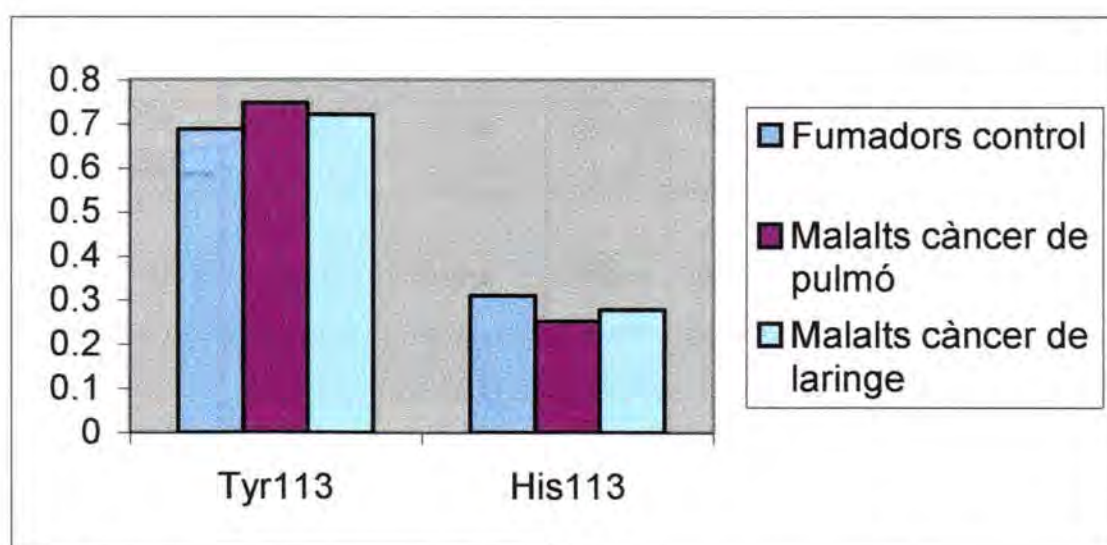


Fig.12.24. Freqüències relatives dels al·lells Tyr113 i His113 en els diferents grups estudiats pel mètode AS-PCR.

S'observa que les freqüències de l'al·lel Tyr113 són més elevades en els malalts que en el controls, la possible relació d'aquest fet amb l'aparició de càncer de pulmó o de laringe serà estudiat posteriorment.

Es comparen ara les freqüències obtingudes pel mètode B (AS-PCR) en les nostres poblacions control estudiades, amb les freqüències d'aquest polimorfisme ja publicades.

Taula 12.9. Freqüències i mètode emprat en cada estudi.

Estudi	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques		Mètode
	AA	AB	BB	A	B	
<b>Edinburgh</b> n=203 (Smith & Harrison, 1997)	0.450	0.490	0.060	0.694	0.306	PCR-RFLP <i>EcoRV</i>
<b>Suècia</b> <b>xinesos n=122</b> (Persson et al., 1999)	0.340	0.480	0.180	0.580	0.420	AS-PCR
<b>França n=172</b> (Benhamou et al., 1998)	0.372	0.448	0.18	0.596	0.404	PCR-RFLP <i>Aspl</i>
<b>Los Angeles</b> <b>Caucàsics</b> n=458 (London et al., 2000)	0.517	0.402	0.081	0.718	0.282	PCR-RFLP <i>Alw26I</i>
<b>Los Angeles</b> <b>Afroamericans.</b> n=242 (London et al., 2000)	0.632	0.318	0.050	0.791	0.209	PCR-RFLP <i>Alw26I</i>
<b>Shanghai n=116</b> (McGlynn et al., 1995)	0.258	0.396	0.345	0.456	0.543	SSCP
<b>Seattle n=105</b> (Hasset et al., 1994a)	0.362	0.562	0.076	0.643	0.357	
<b>Japó n=107</b> (Yoshikawa et al., 2000)	0.330	0.480	0.200	0.565	0.445	SSCP
<b>Texas</b> <b>Afroamericans</b> n= 72 (Wu et al., 2001)	0.613	0.323	0.064	0.775	0.225	PCR-RFLP <i>TthIII I</i>

Taula 12.9. Continuació.

Estudi	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques		Mètode
	AA	AB	BB	A	B	
<b>Texas Mexicans n=76 (Wu et al., 2001)</b>	0.438	0.453	0.109	0.664	0.336	PCR- RFLP <i>TthIII I</i>

Hi ha molta variabilitat tant en les freqüències genotípiques com en les al·lèliques així com en els mètodes emprats per estudiar aquest polimorfisme.

Les nostres freqüències estan d'acord, ja que no presenten diferències estadísticament significatives, amb les de la població caucàsica d'Edimburgh (Smith & Harrison, 1997) ( $P=0,67$ ), amb les dels caucàsics de Los Angeles (London et al., 2000) ( $P=0,32$ ) i amb les de la població de Seattle (Hasset et al., 1994a) ( $P=0,24$ ). En canvi no estan d'acord amb les de la població caucàsica de França (Benhamou et al. 1998) ( $P=0,008$ ).

Les nostres freqüències, tant al·lèliques com genotípiques, estan d'acord ( $P=0,143$ ) amb les publicades en l'estudi del GSEC en caucàsics (Garte et al., 2001).

Taula 12.10. Freqüències publicades pel GSEC.

	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques	
	AA	AB	BB	A	B
<b>GSEC n=685</b>	0.485	0.398	0.117	0.684	0.316

Pel que fa a altres poblacions diferents, les nostres freqüències presenten diferències estadísticament significatives amb les de la població xinesa de Suècia (Persson et al., 1999) ( $P=0,008$ ), amb les de la població afroamericana de Los Angeles (London et al., 2000) ( $P<0,001$ ), amb les de la població de Shanghai (McGlynn et al., 1995) ( $P<0,001$ ) i amb les de la població de Japó (Yoshikawa et al., 2000) ( $P=0,004$ ). En canvi no presenten diferències estadísticament significatives amb les poblacions afroamericana ( $P=0,077$ ) ni mexicana ( $0,77$ ) de Texas (Wu et al., 2001).



## 12.6. RESULTATS DEL POLIMORFISME EPHX1 EXÓ4

El polimorfisme a l'exó 4 del gen EPHX1 presenta dos al·lels diferents en funció d'un canvi de nucleòtid, una transició A→G, que donarà lloc a un canvi d'aminoàcid al codó 139 de la proteïna: His139 (al·lel A) i Arg139 (al·lel B), i pot presentar tres genotips diferents: His139/His139 o genotip AA, His139/Arg139 o genotip AB i Arg139/Arg139 o genotip BB.

Aquest polimorfisme ha estat estudiat per PCR-RFLP segons el mètode descrit per Smith & Harrison, amb resultats satisfactoris (Smith & Harrison, 1997).

Els diagrames de barres mostren les freqüències absolutes de cada genotip:

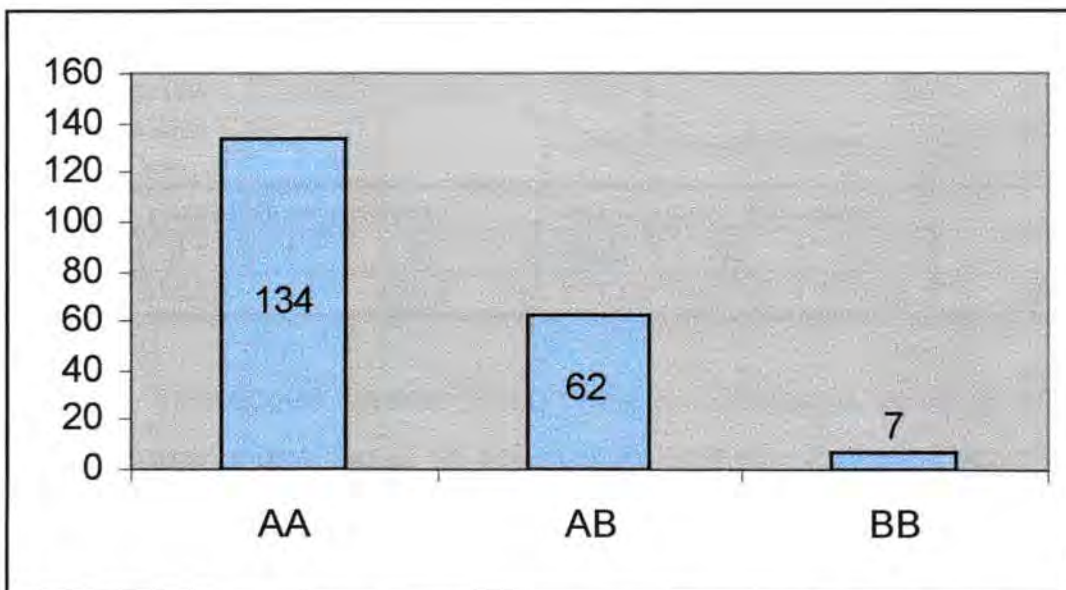


Fig. 12.25. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de fumadors control.



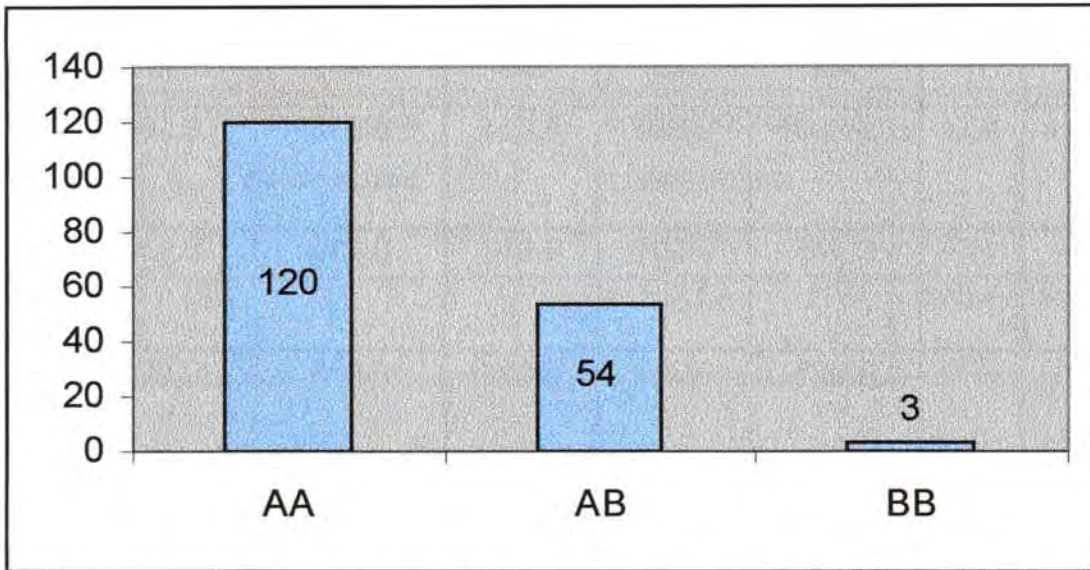


Fig. 12.26. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de pulmó.

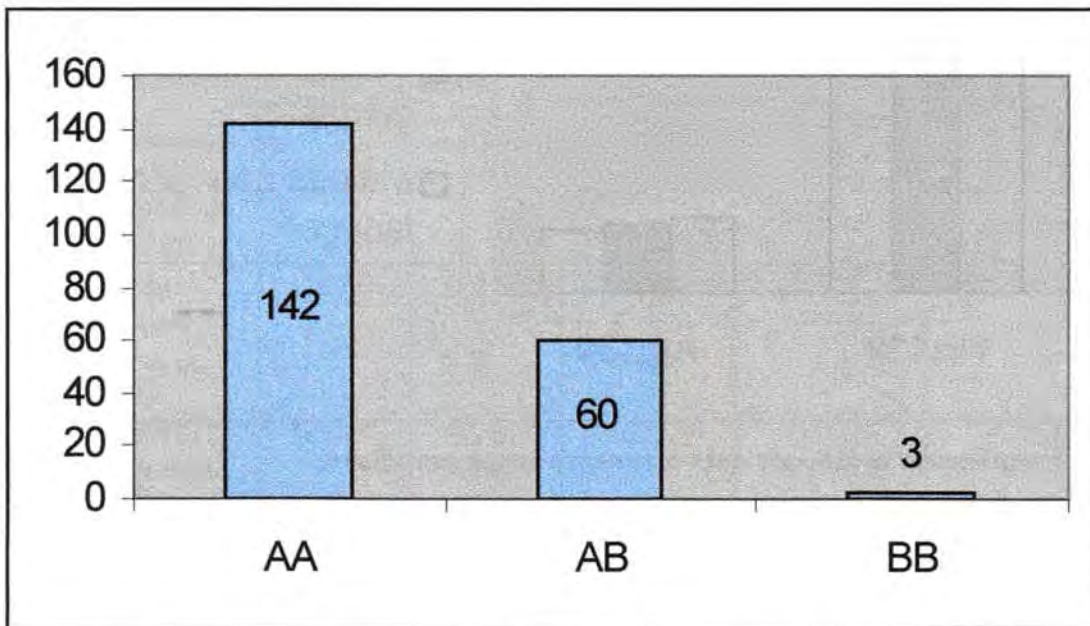


Fig. 12.27. Freqüències absolutes dels genotips en el grup de malalts de càncer de laringe.

Taula 12.11. Freqüències relatives del polimorfisme EPHX1 exó4.

	n <sup>a</sup>	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques	
		AA	AB	BB	A	B
<b>Fumadors Control</b>	203	0.660	0.305	0.034	0.812	0.187
<b>Càncer Pulmó</b>	177	0.678	0.305	0.017	0.830	0.170
<b>Càncer Laringe</b>	205	0.693	0.293	0.014	0.839	0.161

(a) Nombre d'individus estudiats.

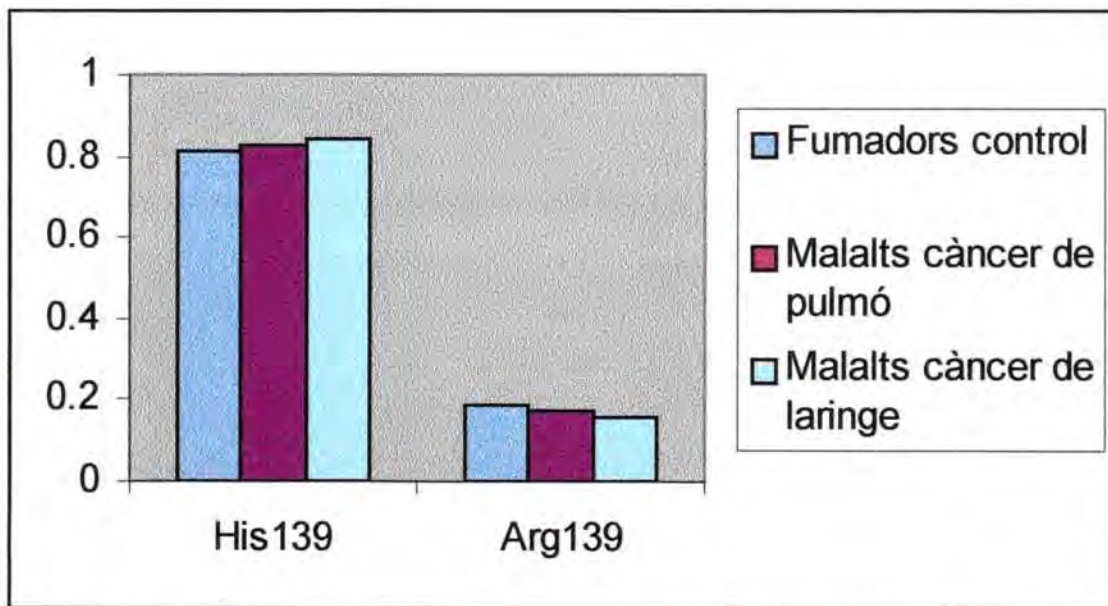


Fig.12.28. Freqüències al·lèliques dels diferents grups estudiats.

S'observa en els controls la freqüència més elevada del genotip BB, el doble aproximadament de la dels malalts de càncer ja sigui pulmó o laringe, així com una freqüència més elevada de l'al·lel Arg139. Si aquestes diferències són o no estadísticament significatives s'estudiarà posteriorment.

L'estudi de l'equilibri de Hardy-Weinberg en les poblacions control dona els següents resultats (taula 12.12):

Taula 12.12. Resultats de l'equilibri de Hardy-Weinberg.

	Freqüències observades			Freqüències esperades			$\chi^2$	P
	AA	AB	BB	AA	AB	BB		
<b>Fumadors Control</b>	134	62	7	133.8	61.6	7.1	0.004	>0.05

Per tant, donat que la P és superior a 0,05, les poblacions control estudiades es troben en equilibri de Hardy-Weinberg.

Es comparen ara les nostres freqüències obtingudes dels controls amb altres freqüències ja publicades (taula 12.13).

Taula 12.13. Freqüències i mètode emprat en cada estudi.

Estudi	Freqüències genotípiques			Freqüències al·lèliques	
	AA	AB	BB	A	B
<b>Edinburgh n=203</b> (Smith & Harrison, 1997)	0.720	0.260	0.020	0.850	0.150
<b>Suècia xinesos n=117</b> (Persson et al., 1999)	0.830	0.150	0.020	0.900	0.100
<b>França n=172</b> (Benhamou et al., 1998)	0.704	0.285	0.012	0.846	0.154
<b>Seattle n=119</b> (Hasset et al., 1994a)	0.587	0.367	0.046	0.770	0.230
<b>GSEC n=686</b> (Garte et al., 2001)	0.609	0.353	0.038	0.785	0.215
<b>Japó n=107</b> (Yoshikawa et al., 2000)	0.700	0.260	0.040	0.830	0.170

Les nostres freqüències estan d'acord amb les dels caucàsics d'Edimburgh (Smith & Harrison, 1997) ( $P=0,36$ ), de França (Benhamou et al., 1998) ( $P=0,29$ ) i de Seattle (Hasset et al., 1994a) ( $P=0,44$ ), així com amb les de l'estudi publicat pel GSEC (Garte et al., 2001) ( $P=0,42$ ).

Estan també d'acord amb les de la població japonesa (Yoshikawa et al., 2000) ( $P=0,72$ ), però en desacord amb les de la població xinesa (Persson et al., 1999) ( $P=0,005$ ).

## 13. ESTUDI DEL DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

### 13.1. DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT ENTRE GSTM1 I GSTM3

Les freqüències dels genotips de GSTM1 en combinació amb els de GSTM3 es donen en la taula 13.1., a on les columnes representen els genotips de GSTM3 (AA: GSTM3\*A/GSTM3\*A; AB GSTM3\*A/GSTM3\*B; i BB: GSTM3\*B/GSTM3\*B) i les fileres els de GSTM1 (A: GSTM1\*A/GSTM1\*A o GSTM1\*A/GSTM1\*0; AB: GSTM1\*A/GSTM1\*B; B: GSTM1\*B/GSTM1\*B GSTM1\*B/GSTM1\*0; i N: genotip nul). El número en cada cel·la correspon a la freqüència absoluta d'individus que posseeixen la combinació dels dos genotips determinats per la filera i la columna.

Taula 13.1. Freqüències de les combinacions dels genotips de GSTM3 i GSTM1.

GSTM1	GSTM3			TOTAL
	AA	AB	BB	
A	27	30	3	60
AB	3	6	0	9
B	31	3	0	34
N	76	20	3	99
<b>TOTAL</b>	137	59	6	202



Suposem la hipòtesi de que els genotips de GSTM3 i els de GSTM1 són independents. El test de  $\chi^2$  dóna com a resultat  $\chi^2=32,99$ ,  $P<0,01$  amb 6 graus de llibertat. La  $P<0,01$  indica que es pot rebutjar la hipòtesi de que GSTM1 i GSTM3 són independents amb una confiança del 99%.

En la figura 13.1. està representada la combinació dels dos genotips, de manera que els valors de GSTM1 s'indiquen en les fileres i els de GSTM3 en la llegenda (correspondrien a les columnes). L'àrea de cada barra és proporcional al nombre d'individus que posseeixen la combinació de genotips, així la primera barra horitzontal de color morat és la proporció corresponent als individus que són GSTM1A i GSTM3 AA que en nombre són 27 respecte al total d'individus GSTM1 A que són 60 (tal com indica la taula anterior). El fet que les barres vermelles i les verdes no comencin totes al mateix punt, indica que existeix una possible associació entre aquests dos gens.

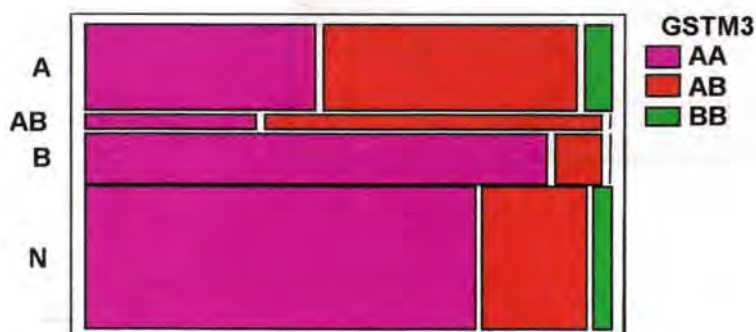


Fig. 13.1. Diagrama GSTM1 x GSTM3.

El fet que en algunes cel·les de la taula el nombre sigui inferior a 5 suposa un problema pel càlcul estadístic, per això s'han agrupat els heterozigots i els homozigots per l'al·lel variant de tots dos gens, és a dir els individus AB o BB es consideren com a un sol grup i es tornen a fer els càlculs.



Taula 13.2. Taula de freqüències agrupant AB+B.

GSTM1	GSTM3		TOTAL
	AA	AB+BB	
A	27	33	60
AB+B	34	9	43
N	76	23	99
<b>TOTAL</b>	137	65	202

El test  $\chi^2$  dona com a resultat un valor de  $\chi^2$  de 20,44 amb 2 graus de llibertat i una P inferior a 0,01. En conseqüència també es pot rebutjar la hipòtesi que GSTM1 i GSTM3 són independents.

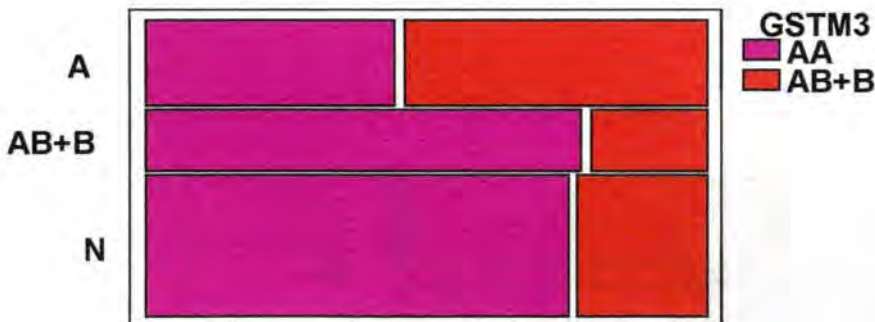


Fig. 13.2. Diagrama GSTM1x GSTM3.

La figura 13.2. és igual que l'anterior excepte pel fet que s'han agrupat certs genotips, de manera que es veu clarament una major presència d'individus amb l'al·lel GSTM3\*B entre els individus que posseeixen l'al·lel GSTM1\*A, la separació entre la barra morada i vermella en el cas de GSTM1 A està desplaçada de la separació en el cas de GSTM1AB +B i GSTM1 nul, si totes les separacions estiguessin a la mateixa alçada això voldria dir que les distribucions són independents entre si.

Si es comparen els valors observats de la combinació dels genotips amb els que s'esperarien de l'atzar existeix una sobrerrepresentació dels individus GSTM1\*A i GSTM3\*B (s'esperarien 19 individus i es troben 33), per tant GSTM1\*A està associat amb un augment de freqüència de GSTM3\*B, suggerint un possible desequilibri de lligament entre els dos gens.

## 13.2. DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT ENTRE EPHX1 EXÓ 3 I GSTM1

La taula 13.3. mostra les freqüències de la combinació de genotips de GSTM1 (fileres) i EPHX1 exó3 (columnes).

Taula 13.3. Freqüències de les combinacions dels genotips de GSTM1 i EPHX1 exó3.

GSTM1	EPHX1 exó3		TOTAL
	AA	AB+BB	
A	28	32	60
AB+B	21	22	43
N	44	56	100
<b>TOTAL</b>	93	110	203

S'han agrupat els genotips GSTM1\*A/GSTM1\*B i GSTM1\*B/GSTM1\*B o GSTM1\*B/GSTM1\*0, així com els genotips AB i BB del gen EPHX1 exó3 per tal de realitzar l'anàlisi.

S'obté un valor de  $\chi^2$  igual a 0,31 amb 2 graus de llibertat, i un valor de P de 0,857; indicant així la independència de les dues distribucions. No s'observa per tant desequilibri de lligament.

En el diagrama següent també s'observa aquesta independència.



Fig. 13.3. Diagrama *GSTM1* x *EPHX1* exó3.

### 13.3. DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT ENTRE *GSTM1* I *EPHX* EXÓ 4.

La taula 13.4. dona les freqüències de les combinacions genotípiques entre *GSTM1* (columnes) i *EPHX1* exó4 (fileres). S'han agrupat els valors dels genotips AB i BB pel polimorfisme *EPHX1* exó4, i els dels genotips *GSTM1*\*A/*GSTM1*\*B i *GSTM1*\*B/*GSTM1*\*B o *GSTM1*\*B/*GSTM1*\*0 del polimorfisme *GSTM1*.

Taula 13.4. Freqüències de les combinacions dels genotips de *GSTM1* i *EPHX1* exó4.

<i>GSTM1</i>	<i>EPHX1</i> exó4		TOTAL
	AA	AB+BB	
A	44	16	60
AB+B	25	18	43
N	65	35	100
TOTAL	134	69	203

El resultat del test de la  $\chi^2$  dona una  $P = 0,263$  ( $\chi^2 = 2,67$ , amb 2 graus de llibertat), per tant no es pot rebutjar la hipòtesi de la independència entre *GSTM1* i *EPHX* exó4.

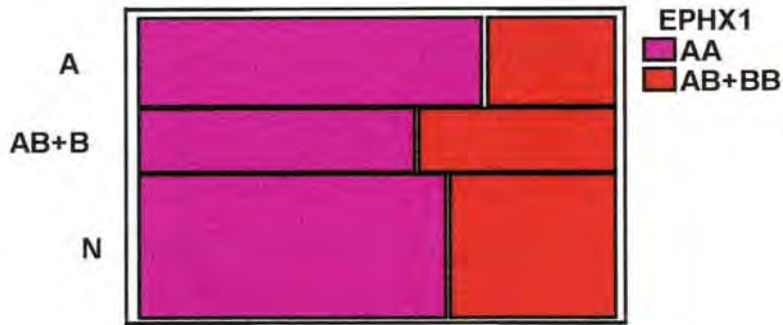


Fig. 13.4. Diagrama *GSTM1* x *EPHX* exó4.

### 13.4. DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT ENTRE *EPHX1* EXÓ3 I *GSTM3*.

La taula de freqüències de la combinació de genotips (*EPHX 1* exó3 en les fileres i *GSTM3* en les columnes) és:

Taula 13.5. Freqüències de les combinacions dels genotips de *EPHX1* exó3 i *GSTM3*.

EPHX1 Exó3	GSTM3		TOTAL
	AA	AB+BB	
AA	62	31	93
AB	63	30	93
BB	12	4	16
<b>TOTAL</b>	137	65	202

Els genotips *GSTM3*\*A/*GSTM3*\*B i *GSTM3*\*B/*GSTM3*\*B s'han agrupat per fer l'anàlisi.



El valor de P obtingut és 0,8046 ( $\chi^2=0,43$ , 2 graus de llibertat), per tant no es pot rebutjar la hipòtesi d'independència entre GSTM3 i EPHX exó 3. No s'observa desequilibri de lligament.

La independència també s'observa en el diagrama.

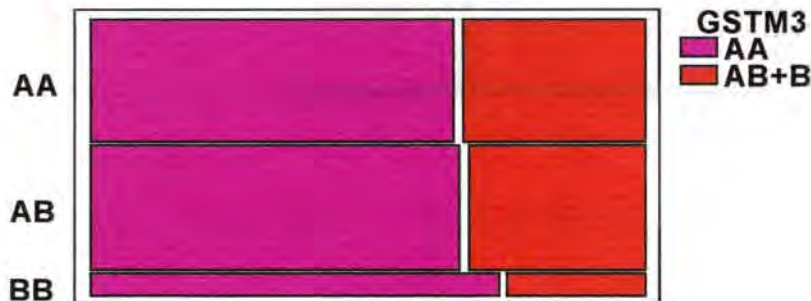


Fig. 13.5. Diagrama EPHX1 exó3 x GSTM3.

## 13.5. DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT ENTRE GSTM3 I EPHX EXÓ 4

La taula 13.6. mostra les freqüències de les combinacions dels genotips de GSTM3 (columnes) i EPHX1 exó 4 (fileres). Per realitzar l'anàlisi s'han agrupat els genotips GSTM3\*A/GSTM3\*B i GSTM3\*B/GSTM3\*B, i els genotips AB i BB del gen EPHX1 a l'exó4.

Taula 13.6. Freqüències de les combinacions dels genotips de GSTM3 i EPHX1 exó4.

EPHX1 Exó4	GSTM3		TOTAL
	AA	AB+BB	
AA	93	41	134
AB+BB	44	24	68
TOTAL	137	65	202



El nivell de significació és de 0,449 ( $\chi^2=0,46$ , amb 1 grau de llibertat). No es pot rebutjar la hipòtesi d'independència entre EPHX1 exó4 i GSTM3.

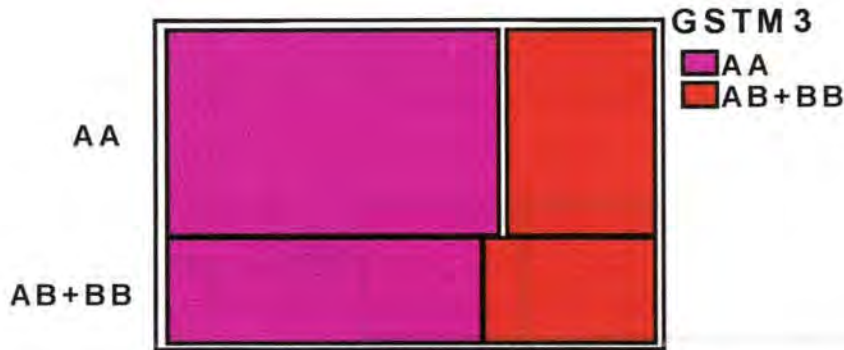


Fig. 13.6. Diagrama EPHX1 exó4 x GSTM3.

No s'observa desequilibri de lligament.

## 13.6. DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT ENTRE ELS EXONS 3 I 4 DEL GEN EPHX1

La taula 13.7. mostra les freqüències per les combinacions genotípiques de l'exó 3 (fileres) i 4 (columnes) del gen EPHX1.

Taula 13.7. Freqüències de les combinacions dels genotips de EPHX1 exons 3 i 4.

Exó3	Exó 4		TOTAL
	AA	AB+BB	
AA	63	30	93
AB	61	33	94
BB	10	6	16
<b>TOTAL</b>	134	69	203

Es fa la mateixa hipòtesi que abans, les freqüències d'EPHX1 exó3 són independents de les freqüències d'EPHX1 exó4. S'obtenen els resultats següents:  $\chi^2=0,26$ , amb 2 graus de llibertat i una  $P=0,876$ .

En ser el valor de P major que 0,05 no podem rebutjar la hipòtesi d'independència, per tant el no s'observa relació entre els genotips dels exons 3 i 4 del gen EPHX1.



Fig. 13.7. Diagrama EPHX1 exó3 x EPHX1 exó4.

Les línies de separació entre les barres de diferents colors coincideixen, el que corrobora el fet de que siguin distribucions independents.

## 14. ESTUDI DE LA MODULACIÓ DEL RISC DE CÀNCER DE PULMÓ PELS POLIMORFISMES DE LES GST I mEH

### 14.1. ESTUDI DE TOTA LA POBLACIÓ

Es comparen les freqüències obtingudes de cada polimorfisme entre tots els casos (malalts de càncer de pulmó) i tots els controls (fumadors sans) i s'estudia si existeixen diferències estadísticament significatives entre les dues distribucions.

Taula 14.1. Distribució de freqüències entre els casos i els controls.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l. (graus de llibertat)	P
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>					
Positiu	74 (41.8)	103 (50.8)	3.03	1	0.08
Nul	103 (58.2)	100 (49.2)			
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>					
Nul	103 (58.2)	100 (49.2)	6.45	3	0.07
A	52 (29.4)	60 (29.6)			
AB	2 (1.1)	9 (4.4)			
B	20 (11.3)	34 (16.7)			
<b>GSTM1<sup>h</sup></b>					
Nul	103 (58.2)	100 (49.2)	5.62	2	0.06
A	52 (29.4)	60 (29.6)			
AB+B	22 (12.4)	43 (21.1)			
<b>GSTT1<sup>c</sup></b>					
Positiu	137 (77.4)	155 (76.3)	0.06	1	0.81
Nul	40 (22.6)	48 (23.6)			
<b>GSTM3<sup>d</sup></b>					
AA	126 (71.2)	137 (67.8)	0.95	2	0.62
AB	48 (27.1)	59 (29.2)			
BB	3 (1.7)	6 (3.0)			
<b>GSTM3<sup>h</sup></b>					
AA	126 (71.2)	137 (67.8)	0.5	1	0.48
AB+BB	51 (28.8)	65 (32.2)			
<b>GSTP1<sup>e</sup></b>					
AA	88 (49.7)	101 (50.2)	0.62	2	0.73
AB	67 (37.8)	80 (39.8)			
BB	22 (12.4)	20 (10.0)			
<b>EPHX1 exó3<sup>f</sup></b>					
AA	97 (54.8)	93 (45.8)	3.49	2	0.17
AB	71 (40.1)	94 (46.3)			
BB	9 (5.1)	16 (7.9)			
<b>EPHX1 exó4<sup>g</sup></b>					
AA	120 (67.8)	134 (66.0)	1.15	2	0.56
AB	54 (30.5)	62 (30.5)			
BB	3 (1.7)	7 (3.4)			

Taula 14.1. Continuació.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>EPHX1 exó4<sup>h</sup></b>					
AA	120 (67.8)	134 (66.0)	0.14	1	0.71
AB+BB	57 (32.2)	69 (33.9)			

(a) El genotip nul correspon a GSTM1\*0/GSTM1\*0

(b) El genotip nul correspon a GSTM1\*0/GSTM1\*0, el genotip A a GSTM1\*A/GSTM1\*0 o GSTM1\*A/GSTM1\*A, el genotip AB a GSTM1\*A/GSTM1\*B i el genotip B a GSTM1\*B/GSTM1\*0 o GSTM1\*B/GSTM1\*B.

(c) El genotip nul correspon a GSTT1\*0/GSTT1\*0 i el positiu a GSTT1\*1/GSTT1\*1 o a GSTT1\*1/GSTT1\*0.

(d) El genotip AA correspon a GSTM3\*A/GSTM3\*A, el genotip AB a GSTM3\*A/GSTM3\*B, i el genotip BB a GSTM3\*B/GSTM3\*B.

(e) El genotip AA correspon a GSTP1\*A/GSTP1\*A, el genotip AB a GSTP1\*A/GSTP1\*B, i el genotip BB a GSTP1\*B/GSTP1\*B.

(f) El genotip AA correspon a Tyr113/Tyr113, el genotip AB a Tyr113/His113 i el genotip BB a His113/His113.

(g) El genotip AA correspon a His139/His139, el genotip AB a His139/Arg139 i el BB a Arg139/Arg139.

(h) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

La distribució de freqüències, en els casos i en els controls, de cada polimorfisme per si sol no presenta diferències estadísticament significatives. L'única distribució que està al llindar de la significació estadística és la de les freqüències del polimorfisme de GSTM1 quan es consideren els nuls, positius A i s'agrupen els positius AB i els positius B com a un sol grup.

Es calculen ara les OR ajustades associades a cada genotip agafant com a categoria de referència el genotip positiu en els polimorfismes GSTM1 i GSTT1 i el genotip salvatge (*wild-type*) en els polimorfismes GSTM3, GSTP1 i EPHX1 exons 3 i 4 per tal de veure el possible risc de les variants genotípiques. En l'estudi del polimorfisme GSTM1 subdividint el genotip positiu en positiu A, positiu AB i positiu B, la categoria de referència és el genotip nul, per estudiar l'efecte dels diferents genotips positius. A la categoria de referència se li assigna una OR de 1. S'ajusta el càlcul de les OR al sexe, a l'edat i al logaritme natural dels PY. Els resultats venen donats amb un interval de confiança del 95%.

Taula 14.2. OR ajustades.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1</b>		
Positiu	1	
Nul	1.35	0.86-2.11
<b>GSTM1</b>		
Nul	1	
A	0.88	0.53-1.47
AB	0.21	0.04-1.09
B	0.64	0.33-1.25
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>		
Nul	1	
A	0.88	0.53-1.47
AB+B	0.54	0.29-1.02
<b>GSTT1</b>		
Positiu	1	
Nul	0.95	0.56-1.61
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.98	0.60-1.59
<b>GSTP1</b>		
AA	1	
AB	0.96	0.59-1.55
BB	1.28	0.60-2.72
<b>EPHX1 exó3</b>		
AA	1	
AB	0.76	0.48-1.21
BB	0.52	0.20-1.33
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	1	0.63-1.62

(a) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

S'observa que cap dels polimorfismes per si sol modula el risc de càncer de pulmó. Destaca però el possible efecte protector associat al genotip GSTM1 AB, quasi és significatiu.



S'estudia la distribució, entre els casos i els controls, de l'activitat de l'epòxid hidrolasa microsomal predita en funció de la combinació dels genotips del gen EPHX1 en els exons 3 i 4. Es basa en la predicció de l'activitat *in vivo* a partir de l'activitat *in vitro* de les diferents variants genotípiques que han fet alguns autors (Hasset et al., 1994a). Es classifiquen les combinacions de genotips en tres nivells d'activitat: alta, intermèdia i baixa, que corresponen a la classificació feta per Benhamou et al. (Benhamou et al., 1998), de manera que:

- Activitat baixa correspon a individus His113/His113 i His139/His139, His113/His113 i His139/Arg139, Tyr113/His113 i His139/His139.
- Activitat intermèdia correspon a individus Tyr113/Tyr113 i His139/His139, Tyr113/His113 i His139/Arg139, His113/His113 i Arg139/Arg139.
- Activitat alta correspon a individus Tyr113/Tyr113 i His139/Arg139, Tyr113/Tyr113 i Arg139/Arg139, Tyr113/His113 i Arg139/Arg139.

Taula 14.3. Distribució de l'activitat de la mEH entre els casos i els controls.

Activitat epòxid hidrolasa	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	OR ajustada	IC (95%)
Baixa	56 (31.6)	76 (37.4)	1	
Intermèdia	88 (49.8)	94 (46.3)	1.31	0.79-2.15
Alta	33 (18.6)	33 (16.2)	1.39	0.73-2.66

Les distribucions entre casos i controls no presenten diferències estadísticament significatives ( $P=0,48$ ,  $\chi^2=1,46$  amb 2 graus de llibertat). Pel que fa a les OR ajustades no són significatives estadísticament.

S'estudia ara el risc associat a diferents combinacions genotípiques entre EPHX1 i GST, algunes d'elles ja publicades amb anterioritat a la literatura. També es combinaran els genotips dels polimorfismes del gen EPHX1 en els exons 3 i 4 amb diferents al·lells de risc dels polimorfismes de les GST. I per últim s'estudiaran combinacions entre l'activitat de la mEH predita genèticament amb els diferents al·lells de risc de les GST.

Taula 14.4. Distribució de freqüències entre els casos i els controls.

Genotips	Casos	Controls	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Nul + GSTT1 Nul	24	28	0.03	1	0.87
Positiu + GSTT1 Nul	16	20			
<b>GSTM1</b>					
A + GSTT1 Nul	12	14	0.14	2	0.93
AB+B + GSTT1 Nul	4	6			
Nul + GSTT1 Nul	24	28			
<b>GSTM1</b>					
A + GSTT1 Positiu	40	46	6.22	2	0.04
AB+B + GSTT1 Positiu	18	37			
Nul + GSTT1 Positiu	79	72			
<b>GSTM1</b>					
Nul + GSTM3 AA	86	76	4.53	1	0.03
Positiu + GSTM3 AA	40	61			
<b>GSTM1</b>					
Nul + GSTP1 AA	49	53	0.19	1	0.66
Positiu + GSTP1 AA	39	48			
<b>GSTM1</b>					
Nul + EPHX1 EXÓ3 AA	59	44	3.49	1	0.06
Positiu + EPHX1 EXÓ3 AA	38	49			
<b>GSTM1</b>					
Nul + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	31	35	0.17	1	0.68
Positiu + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	26	34			
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTM1 Nul	59	44	3.58	1	0.06
AB+BB + GSTM1 Nul	44	56			
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTT1 Nul	20	26	0.15	1	0.70
AB+BB + GSTT1 Nul	20	22			
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTM3 AA	72	62	3.71	1	0.05
AB+BB + GSTM3 AA	54	75			

Taula 14.4. Continuació

Genotips	Casos	Controls	$\chi^2$	g.l.	P
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTP1 AA	57	45	7.74	1	<0.01
AB+BB + GSTP1 AA	31	56			
<b>GSTP1 i EPHX exó3</b>					
AA/AB+BB	31	56	7.76	3	0.05
AB+BB/AA	40	46			
AB+BB/AB+BB	49	54			
AA/AA	57	45			
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>					
AA +GSTM1 Nul	72	65	0.56	1	0.46
AB+BB + GSTM1Nul	31	35			
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>					
AA + GSTT1 Nul	24	29	<0.01	1	>0.95
AB+BB + GSTT1 Nul	16	19			
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>					
AA + GSTM3 AA	86	93	<0.01	1	>0.95
AB+BB + GSTM3 AA	40	44			
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>					
AA + GSTP1 AA	61	70	<0.01	1	>0.95
AB+BB+ GSTP1 AA	27	31			
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b>					
Alta + GSTM1 Nul	19	18			
Intermèdia + GSTM1 Nul	52	39	3.45	2	0.18
Baixa + GSTM1 Nul	32	43			
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b>					
Alta + GSTT1 Nul	7	11			
Intermèdia + GSTT1 Nul	23	22	1.19	2	0.55
Baixa + GSTT1 Nul	10	15			
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b>					
Alta + GSTM3 AA	23	22			
Intermèdia + GSTM3 AA	66	60	3.38	2	0.18
Baixa + GSTM3 AA	37	55			
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b>					
Alta + GSTP1 AA	17	12			
Intermèdia + GSTP1 AA	50	50	5.39	2	0.07
Baixa + GSTP1 AA	21	39			

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs.

(b) Activitat de l'enzim predita genèticament segons Benhamou et al. ( Benhamou et al., 1998).

Taula 14.5. OR ajustades (la categoria de referència és la de presumiblement menor risc).

Genotips	OR ajustada	95%IC
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>		
Nul + GSTT1 Nul	0.72	0.27-1.92
Positiu + GSTT1 Nul	1	
<b>GSTM1<sup>a,c</sup></b>		
A + GSTT1 Nul	1.69	0.56-5.10
AB+B + GSTT1 Nul	0.85	0.18-3.97
Nul + GSTT1 Nul	1	
<b>GSTM1<sup>c</sup></b>		
A + GSTT1 Positiu	0.73	0.41-1.33
AB+B + GSTT1 Positiu	0.47	0.23-0.98
Nul + GSTT1 Positiu	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + GSTM3 AA	1.61	0.93-2.81
Positiu + GSTM3 AA	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + GSTP1 AA	1.16	0.62-2.17
Positiu + GSTP1 AA	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + EPHX1 EXÓ3 AA	1.37	0.71-2.63
Positiu + EPHX1 EXÓ3 AA	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	1.09	0.48-2.48
Positiu + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	1	
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>		
AA + GSTM1 Nul	1.39	0.75-2.25
AB+BB + GSTM1 Nul	1	
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>		
AA + GSTT1 Nul	0.69	0.26-1.80
AB+BB + GSTT1 Nul	1	
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>		
AA + GSTM3 AA	1.39	0.81-2.39
AB+BB + GSTM3 AA	1	

Taula 14.5. Continuació.

Genotips	OR ajustada	95%IC
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b> AA + GSTP1 AA	2.43	1.27-4.66
AB+BB + GSTP1 AA	1	
<b>GSTP1<sup>a</sup> i EPHX exó3<sup>a</sup></b> AA/AB+BB	1	
AB+BB/AA	1.48	0.76-2.89
AB+BB/AB+BB	1.65	0.87-3.14
AA/AA	2.29	1.19-4.41
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b> AA + GSTM1 Nul	1	
AB+BB + GSTM1 Nul	0.89	0.46-1.73
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b> AA + GSTT1 Nul	1	
AB+BB + GSTT1 Nul	0.93	0.37-2.40
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b> AA + GSTM3 AA	1	
AB+BB + GSTM3 AA	1.23	0.69-2.20
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b> AA + GSTP1 AA	1	
AB+BB + GSTP1 AA	1.09	0.56-2.15
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b> Alta + GSTM1 Nul	1.33	0.56-3.18
Intermèdia + GSTM1 Nul	1.62	0.81-3.24
Baixa + GSTM1 Nul	1	
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b> Alta + GSTT1 Nul	0.70	0.18-2.78
Intermèdia + GSTT1 Nul	1.57	0.50-4.94
Baixa + GSTT1 Nul	1	
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b> Alta + GSTM3 AA	1.58	0.72-3.46
Intermèdia + GSTM3 AA	1.58	0.87-2.89
Baixa + GSTM3 AA	1	
<b>Activitat mEH<sup>b</sup></b> Alta + GSTP1 AA	2.83	1.05-7.64
Intermèdia + GSTP1 AA	2.45	1.17-5.14
Baixa + GSTP1 AA	1	

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs.

(b) Activitat de l'enzim predita genèticament segons Benhamou et al. (Benhamou et al., 1998)

(c) La categoria de referència és la combinació que inclou el genotip nul.



Les distribucions de freqüències que presenten diferències estadísticament significatives entre els casos i els controls són les combinacions GSTM1 i GSTT1 positiu, GSTM1 (positiu i nul) i GSTM3\*/GSTM3\*A i EPHX1 exó3 i GSTP1\*/GSTP1\*A. D'altres combinacions presenten estan al llindar de la significació estadística com és el cas de GSTM1 nul i EPHX1 exó3 AA, de EPHX1 exó3 i GSTM3\*/GSTM3\*A i de GSTP1\*/GSTP1\*A i activitat de la mEH predita genèticament.

Pel que fa a les OR ajustades s'observa un possible efecte protector significatiu estadísticament per la combinació GSTM1AB+B i GSTT1 positiu respecte a la combinació GSTM1 nul + GSTT1 positiu.

El càlcul de les OR ajustades de la combinació EPHX1 exó3 i GSTP1 prenent com a categoria de referència a la combinació de menor risc que en aquest cas és GSTP1AA i EPHX1 exó3 AB+BB, dóna com a resultat un augment del risc associat a la combinació GSTP1AA i EPHX1 exó3 AA amb una OR de 2,29 (IC 95%=1,19-4,41).

Prenent com a referència el risc de l'activitat baixa (categoria que en principi té el menor risc associat), s'observa el doble de risc de càncer de pulmó (significatiu estadísticament) si es posseeix una combinació de genotips de EPHX1 que prediuen una activitat intermèdia i alta per l'enzim en aquells individus que són GSTP1\*/GSTP1\*A.

## **14.2. ESTUDI CONSIDERANT NOMÉS LA POBLACIÓ MASCULINA**

Es considera la distribució dels diferents polimorfismes en els casos i en els controls, així com la distribució de l'activitat de l'epòxid hidrolasa predita genèticament, la combinació de genotips dels polimorfismes EPHX1 a l'exó3 i GSTP1 i la combinació de l'activitat de la mEH i el polimorfisme GSTP1. Tots els resultats es presenten a la taula 14.6:

Taula 14.6. Distribució de freqüències entre els casos i els controls.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Positiu	68 (42)	90 (52.6)	3.79	1	0.05
Nul	94 (58)	81 (47.3)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	94 (58)	81 (47.3)	7.06	3	0.07
A	47 (29)	54 (31.6)			
AB	2 (1.2)	9 (5.3)			
B	19 (11.7)	27 (15.8)			
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>					
Nul	94 (58)	81 (47.3)	5.16	2	0.08
A	47 (29)	54 (31.6)			
AB+B	21(25.3)	36 (21.1)			
<b>GSTT1</b>					
Positiu	124 (76.5)	132 (77.2)	0.02	1	0.89
Nul	38 (23.4)	39 (22.8)			
<b>GSTM3</b>					
AA	117 (72.2)	114 (67.0)	1.22	2	0.54
AB	42 (25.9)	51 (30.0)			
BB	3 (1.8)	5 (3.0)			
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>					
AA	117 (72.2)	114 (67.0)	1.04	1	0.31
AB+BB	45 (27.7)	56 (33.0)			
<b>GSTP1</b>					
AA	81 (50)	83 (48.8)	0.24	2	0.88
AB	61 (37.6)	68 (40.0)			
BB	20 (12.3)	19 (11.1)			
<b>EPHX1 exó3</b>					
AA	91 (56.2)	73 (42.7)	6.06	2	0.04
AB	62 (38.2)	85 (49.7)			
BB	9 (5.5)	13 (7.6)			
<b>EPHX1 exó4</b>					
AA	113 (69.7)	112 (65.5)	3.58	2	0.17
AB	48 (29.6)	53 (31.0)			
BB	1 (0.6)	6 (3.5)			

Taula 14.6. Continuació.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>					
AA	113 (69.7)	112 (65.5)	0.69	1	0.41
AB+BB	49 (30.2)	59 (34.5)			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta	30 (18.5)	27 (15.8)	1.34	2	0.51
Intermèdia	79 (48.8)	78 (45.6)			
Baixa	53 (32.7)	66 (38.6)			
<b>GSTP1 i EPHX1 exó3</b>					
AB+BB/AA	39 (24)	37 (21.8)	8.57	3	0.04
AB+BB/AB+BB	42 (25.9)	50 (29.4)			
AA/AA	52 (32.1)	35 (20.6)			
AA/AB+BB	29 (17.9)	48 (28.2)			
<b>Activitat mEH i GSTP1</b>					
Alta/AB+BB	15 (9.2)	16 (9.4)	4.57	5	0.47
Alta/AA	15 (9.2)	11 (6.5)			
Intermèdia/AB+BB	33 (20.4)	38 (22.3)			
Intermèdia/AA	46 (28.4)	39 (22.9)			
Baixa/AB+BB	33 (20.4)	33 (19.4)			
Baixa/AA	20 (12.3)	33 (19.4)			

(a) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

La distribució de les freqüències entre els casos i els controls presenta diferències estadísticament significatives en el cas del polimorfisme EPHX1 exó3 i la combinació GSTP1 i EPHX1 exó3. La distribució del polimorfisme al gen GSTM1 està al llindar de presentar diferències estadísticament significatives.

Aquestes observacions estan d'acord amb les fetes considerant tota la població, únicament es troba variació en el fet que la distribució del polimorfisme del gen EPHX1 a l'exó3 considerant tota la població no presentava diferències estadísticament significatives entre casos i controls i quan es considera només la població masculina sí.

Taula 14.7. OR ajustades associades a aquests polimorfismes i combinacions de polimorfismes.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>		
Positiu	1	
Nul	1.33	0.83-2.13
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>		
Nul	1	
A	0.88	0.52-1.51
AB	0.21	0.04-1.11
B	0.67	0.33-1.35
<b>GSTM1<sup>a,b</sup></b>		
Nul	1	
A	0.89	0.52-1.51
AB+B	0.55	0.29-1.08
<b>GSTT1<sup>c</sup></b>		
Positiu	1	
Nul	1.03	0.59-1.79
<b>GSTM3<sup>a,c</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.87	0.52-1.44
<b>GSTP1<sup>c</sup></b>		
AA	1	
AB	0.98	0.60-1.63
BB	1.14	0.52-2.47
<b>EPHX1 exó3<sup>c</sup></b>		
AA	1	
AB	0.67	0.41-1.09
BB	0.53	0.20-1.41
<b>EPHX1 exó4<sup>a,c</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.94	0.57-1.55
<b>Activitat mEH<sup>d</sup></b>		
Alta	1.39	0.71-2.77
Intermèdia	1.28	0.76-2.15
Baixa	1	

Taula 14.7. Continuació.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTP1 i EPHX1 exó3<sup>d</sup></b>		
AB+BB/AA	1.65	0.82-3.29
AB+BB/AB+BB	1.49	0.77-2.9
AA/AA	2.29	1.15-4.56
AA/AB+BB	1	
<b>Activitat mEH i GSTP1<sup>d</sup></b>		
Alta/AB+BB	1.80	0.69-4.67
Alta/AA	2.57	0.89-7.4
Intermèdia/AB+BB	1.6	0.73-3.52
Intermèdia/AA	2.34	1.09-5.06
Baixa/AB+BB	2.10	0.93-4.66
Baixa/AA	1	

(a) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

(b) La categoria de referència és el genotip nul.

(c) La categoria de referència és el genotip salvatge, així veurem el risc associat a les variants genotípiques.

(d) La categoria de referència és la de menor risc.

La combinació GSTP1AA i EPHX1 exó3 AA representa un risc elevat (OR=2,29, IC(95%)=1,15-4,56) respecte a ser GSTP1AA i EPHX1 exó 3 AB+BB.

Pel que fa a la combinació activitat mEH i polimorfisme GSTP1 s'observa que l'activitat alta i el genotip GSTP1 AA van associats a un augment considerable del risc malgrat que no és significatiu, la OR ajustada associada a la combinació activitat intermèdia i GSTP1 AA sí que és significativa i comporta també un augment del risc, encara que no tant elevat com la combinació anterior. Aquests resultats no es diferencien gaire dels obtinguts per les mateixes combinacions considerant tota la població, l'únic que en la combinació activitat alta i GSTP1 AA en el cas de tota la població la seva OR és significativa.

### 14.3. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ AMB EL TABAC

Es defineixen ara dos subgrups dins de la mostra, dividits en funció de la dosi de tabac a la que han estat exposats, de manera que es consideraran separatament els que tenen menys de 50PY i els que tenen igual o més de 50PY.



Taula 14.8. Distribució de freqüències genotípiques entre casos i controls en la població fumadora de menys de 50PY.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Positiu	32 (49.2)	64 (50.0)	0.01	1	0.91
Nul	33 (50.8)	64 (50.0)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	33 (50.8)	64 (50.0)			
A	22 (33.8)	36 (28.1)	1.69	3	0.64
AB	1 (1.5)	5 (3.9)			
B	9 (13.8)	23 (17.9)			
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>					
Nul	33 (50.8)	64 (50.0)			
A	22 (33.8)	36 (28.1)	1.4	2	0.49
AB+B	10 (15.4)	28 (21.8)			
<b>GSTT1</b>					
Positiu	52 (80)	97 (75.8)	0.44	1	0.51
Nul	13 (20)	31 (24.2)			
<b>GSTM3</b>					
AA	48 (73.8)	84 (65.5)			
AB	16 (24.6)	38 (29.7)	2	2	0.37
BB	1 (1.5)	6 (4.7)			
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>					
AA	48 (73.8)	84 (65.5)	1.35	1	0.24
AB+BB	17 (26.1)	44 (34.4)			
<b>GSTP1</b>					
AA	30 (46.1)	66 (51.9)			
AB	25 (38.4)	49 (38.6)	1.61	2	0.45
BB	10 (15.4)	12 (9.4)			
<b>EPHX1 exó3</b>					
AA	34 (52.3)	58 (45.3)			
AB	29 (44.6)	62 (48.4)	1.41	2	0.49
BB	2 (3.1)	8 (6.3)			
<b>EPHX1 exó3<sup>a</sup></b>					
AA	34 (52.3)	58 (45.3)	0.85	1	0.36
AB+BB	31 (47.7)	70 (54.7)			

Taula 14.8. Continuació.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>EPHX1 exó4</b>					
AA	42 (64.6)	80 (62.5)	0.08	1	0.77
AB	22 (33.8)	44 (34.4)			
BB	1 (1.6)	4 (3.1)			
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>					
AA	42 (64.6)	80 (62.5)	0.08	1	0.77
AB+BB	23 (35.4)	48 (37.5)			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta	11 (16.9)	21 (16.4)	0.54	2	0.76
Intermèdia	35 (53.8)	63 (49.2)			
Baixa	19 (29.2)	44 (34.4)			

(a) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

En estudis previs del grup ja s'havien considerat aquests valors límits (50PY) (To-Figueras et al, 1996; To-Figueras et al., 1997), de fet la mitjana dels PY tant en el grup de fumadors control com en els dos grups de malalts és propera a 50 i per això es considera aquest valor límit. S'intenta veure si el risc associat als polimorfismes està condicionat per la història del fumador, o si aquest risc és el mateix independentment del que s'hagi fumat.

Cap de les distribucions de freqüències genotípiques entre els casos i els controls presenta diferències estadísticament significatives.

Taula 14.9. OR ajustades associades a aquests genotips (població de menys de 50PY).

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>		
Positiu	1	
Nul	1.06	0.54-2.07
<b>GSTM1</b>		
Nul	1	
A	1.05	0.49-2.25
AB	0.42	0.04-4.22
B	0.87	0.33-2.28
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>		
Nul	1	
A	1.05	0.49-2.25
AB+B	0.78	0.31-1.96
<b>GSTT1<sup>b</sup></b>		
Positiu	1	
Nul	0.69	0.31-1.57
<b>GSTM3<sup>a,b</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.72	0.34-1.51
<b>GSTP1<sup>b</sup></b>		
AA	1	
AB	1.11	0.54-2.32
BB	3.02	1.01-9.01
<b>EPHX1 exó3<sup>a,b</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.65	0.33-1.29
<b>EPHX1 exó4<sup>a,b</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	1.02	0.51-2.06
<b>Activitat mEH<sup>c</sup></b>		
Alta	1.39	0.50-3.83
Intermèdia	1.71	0.79-3.70
Baixa	1	

(a) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

(b) La categoria de referència és el genotip salvatge.

(e) La categoria de referència és la de menor risc.

S'observa un risc significatiu associat al genotip GSTP1 BB respecte al GSTP1 AA, La resta de genotips no modifiquen el risc.

Taula 14.10 . Distribució de freqüències genotípiques entre els casos i els controls en la població fumadora d'igual o més de 50PY.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Positiu	42 (37.5)	39 (52.0)	3.85	1	0.05
Nul	70 (62.5)	36 (48.0)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	70 (62.5)	36 (48.0)	6.30	3	0.09
A	30 (26.8)	24 (32)			
AB	1 (0.9)	4 (5.3)			
B	11 (9.8)	11 (14.7)			
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>					
Nul	70 (62.5)	36 (48.0)	4.77	2	0.09
A	30 (26.8)	24 (32)			
AB+B	12 (10.7)	15 (20.0)			
<b>GSTT1</b>					
Positiu	85 (75.9)	58 (77.3)	0.05	1	0.82
Nul	27 (24.1)	17 (22.7)			
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>					
AA	78 (69.6)	53 (71.6)	0.08	1	0.77
AB+BB	32 (30.4)	21 (28.4)			
<b>GSTP1</b>					
AA	58 (51.8)	35 (47.3)	0.4	2	0.82
AB	42 (37.5)	31 (41.9)			
BB	12 (10.7)	8 (10.8)			
<b>EPHX1 exó3</b>					
AA	63 (56.3)	35 (46.6)	2.18	2	0.33
AB	42 (37.5)	32 (42.6)			
BB	7 (6.25)	8 (10.6)			
<b>EPHX1 exó4</b>					
AA	78 (69.6)	54 (72.0)	1.21	2	0.54
AB	32 (28.6)	18 (24.0)			
BB	2 (1.8)	3 (4.0)			
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>					
AA	78 (69.6)	54 (72.0)	0.12	1	0.73
AB+BB	34 (30.4)	21 (28.0)			

Taula 14.10. Continuació.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>Activitat mEH</b>					
Alta	22 (19.6)	12 (16.0)			
Intermèdia	53 (47.3)	31 (41.3)	1.82	2	0.40
Baixa	37 (33)	32 (42.7)			

(a) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

Taula 14.11. OR ajustades associades a aquests genotips (població fumadora d'igual o més de 50PY).

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>		
Positiu	1	
Nul	1.65	0.89-3.06
<b>GSTM1</b>		
Nul	1	
A	0.73	0.36-1.47
AB	0.52	0.19-1.36
B	2.92	0.4-17.1
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>		
Nul	1	
A	0.73	0.36-1.47
AB+B	0.41	0.17-1.01
<b>GSTT1<sup>b</sup></b>		
Positiu	1	
Nul	1.17	0.56-2.41
<b>GSTM3<sup>a,b</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	1.19	0.61-2.34
<b>GSTP1<sup>b</sup></b>		
AA	1	
AB	0.82	0.43-1.59
BB	0.85	0.31-2.36



Taula 14.11. Continuació.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>EPHX1 exó3<sup>b</sup></b>		
AA	1	
AB	0.79	0.42-1.51
BB	0.54	0.17-1.69
<b>EPHX1 exó4<sup>a b</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	1.14	0.58-2.22
<b>Activitat mEH<sup>c</sup></b>		
Alta	1.51	0.62-3.64
Intermèdia	1.33	0.67-2.6
Baixa	1	

(a) S'agrupen els genotips AB i BB en un sol grup (AB+BB), ja que el nombre d'individus en alguna de les caselles és inferior a 5.

(b) La categoria de referència és el genotip salvatge.

(c) La categoria de referència és la de menor risc.

Cap genotip comporta un augment significatiu del risc.

## 15. ESTUDI DE LA MODULACIÓ DEL RISC DE CÀNCER DE LARINGE PELS POLIMORFISMES DE LES GST I mEH.

### 15.1. ESTUDI DE TOTA LA POBLACIÓ

Es comparen les freqüències obtingudes de cada polimorfisme entre tots els casos (malalts de càncer de laringe) i tots els controls (fumadors sans) i s'estudia si existeixen diferències estadísticament significatives entre les dues distribucions.

Taula 15.1. Distribucions de freqüències entre els casos i els controls.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>					
Positiu	108 (52.7)	103 (50.8)	0.15	1	0.69
Nul	97 (47.3)	100 (49.2)			
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>					
Nul	97 (47.3)	100 (49.2)	2.14	3	0.54
A	61 (29.7)	60 (29.6)			
AB	16 (7.8)	9 (4.4)			
B	31 (15.1)	34 (16.7)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	97 (47.3)	100 (49.2)	0.22	2	0.89
A	61 (29.7)	60 (29.6)			
AB+B	47 (22.9)	43 (21.1)			
<b>GSTT1<sup>c</sup></b>					
Positiu	170 (82.9)	155 (76.3)	2.72	1	0.09
Nul	35 (17.1)	48 (23.6)			
<b>GSTM3<sup>d</sup></b>					
AA	143 (70.0)	137 (67.8)	0.42	2	0.81
AB	54 (26.5)	59 (29.2)			
BB	7 (3.5)	6 (3.0)			
<b>GSTP1<sup>e</sup></b>					
AA	101 (49.2)	101 (50.2)	0.14	2	0.93
AB	85 (41.4)	80 (39.8)			
BB	19 (9.2)	20 (10.0)			
<b>EPHX1 exó3<sup>f</sup></b>					
AA	105 (51.7)	93 (45.8)	1.44	2	0.49
AB	83 (40.9)	94 (46.3)			
BB	15 (7.4)	16 (7.9)			
<b>EPHX1 exó4<sup>g</sup></b>					
AA	142 (69.3)	134 (66.0)	1.85	2	0.39
AB	60 (29.3)	62 (30.5)			
BB	3 (1.4)	7 (3.4)			

Taula 15.1. Continuació.

Genotips	CASOS	CONTROLS	$\chi^2$	g.l.	P
	n (%)	n (%)			
<b>EPHX1 exó4<sup>h</sup></b>					
AA	142 (69.3)	134 (66.0)	0.49	1	0.48
AB+BB	63 (30.7)	69 (34.0)			

(a) El genotip nul correspon a GSTM1\*0/GSTM1\*0.

(b) El genotip nul correspon a GSTM1\*0/GSTM1\*0, el genotip A a GSTM1\*A/GSTM1\*0 o GSTM1\*A/GSTM1\*A, el genotip AB a GSTM1\*A/GSTM1\*B i el genotip B a GSTM1\*B/GSTM1\*0 o GSTM1\*B/GSTM1\*B.

(c) El genotip nul correspon a GSTT1\*0/GSTT1\*0 i el positiu a GSTT1\*1/GSTT1\*1 o a GSTT1\*1/GSTT1\*0.

(d) El genotip AA correspon a GSTM3\*A/GSTM3\*A, el genotip AB a GSTM3\*A/GSTM3\*B, i el genotip BB a GSTM3\*B/GSTM3\*B.

(e) El genotip AA correspon a GSTP1\*A/GSTP1\*A, el genotip AB a GSTP1\*A/GSTP1\*B, i el genotip BB a GSTP1\*B/GSTP1\*B.

(f) El genotip AA correspon a Tyr113/Tyr113, el genotip AB a Tyr113/His113 i el genotip BB a His113/His113.

(g) El genotip AA correspon a His139/His139, el genotip AB a His139/Arg139 i el BB a Arg139/Arg139.

(h) S'agrupen els individus heterozigots i homozigots de l'al·lel variant ja que en alguna casella hi ha menys de 5 individus

Taula 15.2. OR ajustades associades a aquests genotips, prenent com a categoria de referència el genotip salvatge.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1</b>		
Positiu	1	
Nul	0.92	0.59-1.43
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>		
Nul	1	
A	1.03	0.62-1.7
AB	1.6	0.6-4.26
B	1.03	0.55-1.94
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>		
Nul	1	
A	1.03	0.62-1.7
AB+B	1.15	0.66-2.03
<b>GSTT1</b>		
Nul	0.58	0.33-0.99
Positiu	1	

Taula 15.2. Continuació.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM3</b>		
AA	1	
AB	0.94	0.58-1.54
BB	1.01	0.26-3.98
<b>GSTP1</b>		
AA	1	
AB	1.24	0.78-1.97
BB	1.08	0.5-2.33
<b>EPHX1 exó3</b>		
AA	1	
AB	0.69	0.44-1.09
BB	0.57	0.23-1.37
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.98	0.61-1.56

- (a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs  
 (b) La categoria de referència és el genotip nul.

Cap de les distribucions anteriors presenta diferències estadísticament significatives entre els casos i els controls. El genotip GSTT1 nul pot exercir un cert efecte protector, la resta de polimorfismes estudiats no modulen el risc de càncer de laringe de manera significativa.

S'estudia ara l'activitat de la mEH predita genèticament en els casos i els controls utilitzant, igual que per l'estudi del càncer de pulmó, la classificació de Benhamou et al. (Benhamou et al., 1998).

La distribució de l'activitat no presenta diferències estadísticament significatives entre els casos i els controls ( $\chi^2 = 0,45$ , amb 2 graus de llibertat i un valor de P de 0,80). Les OR ajustades no són significatives.

Taula 15.3. Distribució de l'activitat de la mEH entre els casos i els controls i OR ajustades.

Activitat epòxid hidrolasa	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	OR ajustada	IC (95%)
Baixa	75 (36.9)	76 (37.4)	1	
Intermèdia	90 (44.3)	94 (46.3)	1.23	0.76-2.01
Alta	38 (18.7)	33 (16.2)	1.37	0.73-2.58

S'estudien ara diferents combinacions entre els gens de les GST i de la mEH (Taula 15.4).

Taula 15.4. Distribució de freqüències de combinacions genotípiques entre els casos i els controls.

Genotips	Casos	Controls	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Nul + GSTT1 Nul	15	28	1.94	1	0.16
Positiu + GSTT1 Nul	20	20			
<b>GSTM1</b>					
A + GSTT1 Nul	13	14	2.06	2	0.36
AB+B + GSTT1 Nul	7	6			
Nul + GSTT1 Nul	15	28			
<b>GSTM1</b>					
A + GSTT1 Positiu	48	46	0.12	2	0.94
AB+B + GSTT1 Positiu	40	37			
Nul + GSTT1 Positiu	82	72			
<b>GSTM1</b>					
Nul + GSTM3 AA	79	76	<0.01	1	>0.95
Positiu + GSTM3 AA	64	61			



Taula 15.4. Continuació.

Genotips	Casos	Controls	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Nul + GSTP1 AA	51	53	0.28	1	0.78
Positiu + GSTP1 AA	50	48			
<b>GSTM1</b>					
Nul + EPHX1 EXÓ3 AA	49	44	0.01	1	0.93
Positiu + EPHX1 EXÓ3 AA	56	49			
<b>GSTM1</b>					
Nul + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	32	35	<0.01	1	>0.95
Positiu + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	31	34			
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTM1 Nul	49	44	0.97	1	0.32
AB+BB + GSTM1 Nul	47	46			
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTT1 Nul	22	26	0.63	1	0.43
AB+BB + GSTT1 Nul	13	22			
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTM3 AA	74	62	1.31	1	0.25
AB+BB + GSTM3 AA	68	75			
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>					
AA + GSTP1 AA	57	45	2.85	1	0.09
AB+BB + GSTP1 AA	44	56			
<b>GSTP1 i EPHX exó3</b>					
AA/AB+BB	44	56	2.88	3	0.41
AB+BB/AA	48	46			
AB+BB/AB+BB	54	54			
AA/AA	57	45			
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>					
AA + GSTM1 Nul	65	65	0.09	1	0.76
AB+BB + GSTM1 Nul	32	35			
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>					
AA + GSTT1 Nul	26	29	1.74	1	0.19
AB+BB + GSTT1 Nul	9	19			

Taula 15.4. Continuació.

Genotips	Casos n	Controls n	$\chi^2$	g.l.	P
<b>EPHX1 EXO4<sup>a</sup></b>					
AA + GSTM3 AA	97	93	<0.01	1	>0.95
AB+BB + GSTM3 AA	46	44			
<b>EPHX1 EXO4<sup>a</sup></b>					
AA + GSTP1 AA	68	70	0.09	1	0.76
AB+BB + GSTP1 AA	33	31			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta + GSTM1 Nul	21	18	0.61	2	0.74
Intermèdia + GSTM1 Nul	38	39			
Baixa + GSTM1 Nul	37	43			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta + GSTT1 Nul	5	11	1.78	2	0.41
Intermèdia + GSTT1 Nul	21	22			
Baixa + GSTT1 Nul	9	15			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta + GSTM3 AA	29	22	1.06	2	0.59
Intermèdia + GSTM3 AA	62	60			
Baixa + GSTM3 AA	51	55			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta + GSTP1 AA	22	12	3.61	2	0.16
Intermèdia + GSTP1 AA	46	59			
Baixa + GSTP1 AA	33	39			

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

Cap de les combinacions anteriors presenta diferències estadísticament significatives. Es calculen les OR ajustades associades a elles prenent com a categoria de referència la de presumiblement de menor risc.

Taula 15.5. OR ajustades associades a les combinacions de genotips.

Genotips	OR ajustada	95%IC
<b>GSTM1</b>		
Nul + GSTT1 Nul	0.49	0.18-1.39
Positiu + GSTT1 Nul	1	
<b>GSTM1</b>		
A + GSTT1 Nul	2.28	0.7-7.4
AB+B + GSTT1 Nul	1.61	0.4-6.5
Nul + GSTT1 Nul	1	
<b>GSTM1</b>		
A + GSTT1 Positiu	0.85	0.48-1.50
AB+B + GSTT1 Positiu	1.02	0.55-1.89
Nul + GSTT1 Positiu	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + GSTM3 AA	1.02	0.61-1.73
Positiu + GSTM3 AA	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + GSTP1 AA	0.89	0.48-1.64
Positiu + GSTP1 AA	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + EPHX1 EXÓ3 AA	1.04	0.55-1.93
Positiu + EPHX1 EXÓ3 AA	1	
<b>GSTM1</b>		
Nul + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	1	0.45-2.25
Positiu + EPHX1 EXÓ4 AB+BB	1	
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>		
AA + GSTM1 Nul	1.58	0.83-3.00
AB+BB + GSTM1 Nul	1	
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup> i</b>		
AA + GSTT1 Nul	2.27	0.78-6.64
AB+BB + GSTT1 Nul	1	

Taula 15.5. Continuació.

<b>Genotips</b>	<b>OR ajustada</b>	<b>95%IC</b>
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>		
AA + GSTM3 AA	1.34	0.79-2.26
AB+BB + GSTM3 AA	1	
<b>EPHX1 EXÓ3<sup>a</sup></b>		
AA + GSTP1 AA	1.78	0.96-3.32
AB+BB + GSTP1 AA	1	
<b>GSTP1 i EPHX exó3</b>		
AA/AB+BB	1	
AB+BB/AA	1.84	0.97-3.47
AB+BB/AB+BB	1.4	0.79-2.57
AA/AA	1.83	0.96-3.46
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>		
AA + GSTM1 Nul	1	
AB+BB + GSTM1 Nul	0.95	0.48-1.85
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>		
AA + GSTT1 Nul	1	
AB+BB + GSTT1 Nul	0.33	0.11-1.02
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>		
AA + GSTM3 AA	1	
AB+BB + GSTM3 AA	1.16	0.66-2.02
<b>EPHX1 EXÓ4<sup>a</sup></b>		
AA + GSTP1 AA	1	
AB+BB + GSTP1 AA	1.41	0.72-2.76
<b>Activitat mEH</b>		
Alta + GSTM1 Nul	1.43	0.61-3.41
Intermèdia + GSTM1 Nul	1.58	0.76-3.27
Baixa + GSTM1 Nul	1	
<b>Activitat mEH</b>		
Alta + GSTT1 Nul	0.73	0.56-3.41
Intermèdia + GSTT1 Nul	3.25	0.87-12.06
Baixa + GSTT1 Nul	1	

Taula 15.5. Continuació.

Genotips	OR ajustada	95%IC
<b>Activitat mEH</b>		
Alta + GSTM3 AA	1.43	0.68-3.01
Intermèdia + GSTM3 AA	1.26	0.71-2.26
Baixa + GSTM3 AA	1	
<b>Activitat mEH</b>		
Alta + GSTP1 AA	2.85	1.11-7.35
Intermèdia + GSTP1 AA	1.32	0.66-2.63
Baixa + GSTP1 AA	1	

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

El fet de posseir la combinació d'activitat alta i GSTP1\*/GSTP1\*A comporta un risc de 2.85 estadísticament significatiu, respecte a ser activitat baixa i GSTP1\*/GSTP1\*A. S'observa un risc de quasi el doble i al llindar de la significació per la combinació GSTP1\*/GSTP1\*A i EPHX1 exó3AA, respecte a GSTP1\*/GSTP1\*A i EPHX1 exó3 AB+BB. També s'observa un possible efecte protector per a la combinació EPHX1 exó4 AB+BB i GSTT1 nul al llindar de la significació estadística.

## 15.2. ESTUDI CONSIDERANT NOMÉS LA POBLACIÓ MASCULINA

S'estudia la distribució dels diferents polimorfismes en les dues poblacions, així com la distribució de l'activitat de l'epòxid hidrolasa predita genèticament, la combinació de genotips dels polimorfismes EPHX1 a l'exó3 i GSTP1 i la combinació de l'activitat de la mEH i el polimorfisme GSTP1.



Taula 15.6. Distribució de freqüències entre els casos i els controls.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Positiu	106 (52.5)	90 (52.6)	<0.01	1	>0.95
Nul	96 (47.5)	81 (47.3)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	96 (47.5)	81 (47.3)	1.14	3	0.77
A	60 (29.7)	54 (31.6)			
AB	16 (7.9)	9 (5.3)			
B	30 (14.9)	27 (15.8)			
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>					
Nul	96 (47.5)	81 (47.3)	0.23	2	0.89
A	60 (29.7)	54 (31.6)			
AB+B	46 (22.8)	36 (21.1)			
<b>GSTT1</b>					
Positiu	169 (83.7)	132 (77.2)	2.49	1	0.11
Nul	33 (16.3)	39 (22.8)			
<b>GSTM3</b>					
AA	141 (70.1)	114 (67.0)	0.64	2	0.72
AB	53 (26.3)	51 (30.0)			
BB	7 (3.4)	5 (3.0)			
<b>GSTP1</b>					
AA	100 (49.5)	83 (48.8)	0.32	2	0.85
AB	83 (41.1)	68 (40.0)			
BB	19 (9.4)	19 (11.1)			
<b>EPHX1 exó3</b>					
AA	104 (52)	73 (42.7)	3.27	2	0.19
AB	82 (41)	85 (49.7)			
BB	14 (7)	13 (7.6)			
<b>EPHX1 exó4</b>					
AA	140 (69.3)	112 (65.5)	1.87	2	0.39
AB	59 (29.2)	53 (31.0)			
BB	3 (1.5)	6 (3.5)			
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>					
AA	140 (69.3)	112 (65.5)	0.61	1	0.43
AB+BB	62 (30.7)	59 (34.5)			

Taula 15.6. Continuació.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>Activitat mEH</b>					
Alta	38 (19)	27 (15.8)	0.66	2	0.72
Intermèdia	88 (44)	78 (45.6)			
Baixa	74 (37)	66 (38.6)			
<b>GSTP1 i EPHX1 exó3</b>					
AA/AA	56 (28)	35 (20.6)	4.08	3	0.25
AA/AB+BB	44 (22)	48 (28.2)			
AB+BB/AA	48 (24)	37 (21.8)			
AB+BB/AB+BB	52 (26)	50 (29.4)			
<b>Activitat mEH i GSTP1</b>					
Alta/AA	22 (11)	11 (6.5)	2.86	5	0.72
Alta/AB+BB	16 (8)	16 (9.4)			
Intermèdia/AA	45 (22.5)	39 (22.9)			
Intermèdia/AB+BB	43 (21.5)	38 (22.3)			
Baixa/AA	33 (16.5)	33 (19.4)			
Baixa/AB+BB	41 (20.5)	33 (19.4)			

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

Cap de les distribucions anteriors presenta diferències estadísticament significatives.

Les OR ajustades associades a aquests polimorfismes i a aquestes combinacions de polimorfismes es mostren en la següent taula (Taula 15.7). La categoria de referència en els cas de considerar un polimorfisme sol és la del genotip salvatge, quan s'estudia l'activitat de la mEH s'agafa com a categoria de referència la d'activitat baixa que en principi és la que té menor risc, i en l'estudi de les combinacions entre activitat mEH i GSTP1 i entre EPHX1 exó3 i GSTP1 s'agafa com a categoria de referència la de menor risc.

Taula 15.7. OR ajustades associades als polimorfismes i combinacions de polimorfismes.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1</b>		
Positiu	1	
Nul	0.96	0.61-1.5
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>		
Nul	1	
A	0.98	0.58-1.64
AB	1.41	0.54-3.73
B	1.04	0.54-1.99
<b>GSTM1<sup>b</sup></b>		
Nul	1	
A	0.98	0.58-1.64
AB+B	1.13	0.64-2.02
<b>GSTT1</b>		
Positiu	1	
Nul	0.56	0.32-1.00
<b>GSTM3</b>		
AA	1	
AB	0.89	0.54-1.46
BB	0.98	0.24-3.97
<b>GSTP1</b>		
AA	1	
AB	1.2	0.75-1.97
BB	0.99	0.46-2.14
<b>EPHX1 exó3</b>		
AA	1	
AB	0.65	0.41-1.03
BB	0.99	0.46-2.14
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.98	0.62-1.56
<b>Activitat mEH</b>		
Alta	1.45	0.76-2.79
Intermèdia	1.23	0.75-2.03
Baixa	1	

Taula 15.7. Continuació.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTP1 i EPHX1 exó3</b>		
AA/AA	1.90	0.99-3.67
AB+BB/AA	1.86	0.97-3.57
AB+BB/AB+BB	1.31	0.71-2.45
AA/AB+BB	1	
<b>Activitat mEH i GSTP1</b>		
Alta/AA	3.04	1.14-8.08
Alta/AB+BB	1.21	0.49-3.00
Intermèdia/AA	1.42	0.69-2.91
Intermèdia/AB+BB	1.86	0.9-3.82
Baixa/AB+BB	1.58	0.76-3.30
Baixa/AA	1	

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

(b) La categoria de referència és el genotip nul.

El genotip GSTT1 nul podria esdevenir un factor protector i les combinacions activitat mEH alta/GSTP1\*A/GSTP1\*A i GSTP1\*A/GSTP1\*A/EPHX1 exó3 AA factors de risc.

Els resultats obtinguts considerant exclusivament la població masculina no presenten diferències importants respecte als resultats considerant ambdós sexes.

### 15.3. ESTUDI DE LA INTERACCIÓ AMB EL TABAC

Es divideix a la població fumadora en funció de la dosi de tabac a la que ha estat exposada. Es comparen les freqüències obtingudes per cada polimorfisme i per l'activitat de la mEH predita genèticament en els malalts i en els controls i després es calculen les OR ajustades associades a elles.

Taula 15.8. Distribució de freqüències dels diferents polimorfismes entre els casos i els controls en la població fumadora de menys de 50PY.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Positiu	54 (57.5)	64 (50.0)	1.21	1	0.27
Nul	40 (42.5)	64 (50.0)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	40 (42.5)	64 (50.0)			
A	26 (27.6)	36 (28.1)	5.22	3	0.15
AB	11 (11.7)	5 (3.9)			
B	17 (18)	23 (17.9)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	40 (42.5)	64 (50.0)			
A	26 (27.6)	36 (28.1)	1.99	2	0.37
AB+B	28 (29.8)	28 (21.8)			
<b>GSTT1</b>					
Positiu	77 (82)	97 (75.8)	1.20	1	0.27
Nul	17 (18)	31 (24.2)			
<b>GSTM3</b>					
AA	66 (71.0)	84 (65.6)			
AB	23 (24.7)	38 (29.7)	0.72	2	0.69
BB	4 (4.3)	6 (4.7)			
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>					
AA	66 (71)	84 (65.6)	0.71	1	0.40
AB+BB	27 (29)	44 (34.4)			
<b>GSTP1</b>					
AA	42 (44.7)	66 (51.9)			
AB	45 (47.8)	49 (38.6)	1.93	2	0.38
BB	7 (7.5)	12 (9.4)			
<b>EPHX1 exó3</b>					
AA	49 (52.7)	58 (45.3)			
AB	36 (38.7)	62 (48.4)	2.17	2	0.34
BB	8 (8.6)	8 (6.3)			



Taula 15.8. Continuació.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>EPHX1 exó4</b>					
AA	69 (73.4)	80 (62.5)			
AB	23 (24.4)	44 (34.4)	2.92	2	0.23
BB	2 (2.1)	4 (3.1)			
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>					
AA	69 (73.4)	80 (62.5)	2.92	1	0.09
AB+BB	25 (26.6)	48 (37.5)			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta	15 (16.1)	21 (16.4)			
Intermèdia	43 (46.2)	63 (49.2)	0.26	2	0.88
Baixa	35 (37.6)	44 (34.4)			

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

Taula 15.9. OR ajustades associades a aquests genotips.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1</b>		
Positiu	1	
Nul	0.84	0.45-1.56
<b>GSTM1</b>		
Nul	1	
A	0.97	0.47-2.01
AB	2.67	0.72-9.92
B	1.19	0.51-2.78
<b>GSTM1</b>		
Nul	1	
A	0.97	0.47-2.01
AB+B	1.47	0.69-3.14
<b>GSTT1</b>		
Positiu	1	
Nul	0.59	0.28-1.26
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.90	0.47-1.74

Taula 15.9. Continuació

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTP1</b>		
AA	1	
AB	0.53	0.81-2.90
BB	1.06	0.33-3.44
<b>EPHX1 exó3</b>		
AA	1	
AB	0.58	0.31-1.11
BB	1.22	0.36-4.13
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	0.72	0.37-1.39
<b>Activitat mEH</b>		
Alta	1.07	0.43-2.64
Intermèdia	1.05	0.54-2.07
Baixa	1	

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

Taula 15.10. Distribució de freqüències dels diferents polimorfismes entre els casos i els controls en la població fumadora d'igual o més de 50PY.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTM1</b>					
Positiu	54 (48.7)	39 (52.0)	0.2	1	0.65
Nul	57 (51.3)	36 (48.0)			
<b>GSTM1</b>					
Nul	57 (51.3)	36 (48.0)	0.21	3	0.95
A	35 (31.5)	24 (32.0)			
AB	5 (4.5)	4 (5.3)			
B	14 (12.6)	11 (14.7)			
<b>GSTM1<sup>a</sup></b>					
Nul	57 (51.3)	36 (48.0)	0.31	2	0.86
A	35 (31.5)	24 (32.0)			
AB+B	19 (17.1)	15 (20.0)			

Taula 15.10. Continuació.

Genotips	CASOS n (%)	CONTROLS n (%)	$\chi^2$	g.l.	P
<b>GSTT1</b>					
Positiu	93 (83.8)	58 (77.3)	1.22	1	0.27
Nul	18 (16.2)	17 (22.7)			
<b>GSTM3</b>					
AA	77 (69.4)	53 (71.6)	2.04	2	0.36
AB	31 (27.9)	21 (28.4)			
BB	3 (2.7)	0 (0)			
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>					
AA	77 (69.4)	53 (71.6)	0.11	1	0.74
AB+BB	34 (30.6)	21 (28.4)			
<b>GSTP1</b>					
AA	59 (53.1)	35 (47.3)	0.7	2	0.70
AB	40 (36)	31 (41.9)			
BB	12 (10.8)	8 (10.8)			
<b>EPHX1 exó3</b>					
AA	56 (50.9)	35 (46.6)	1.18	2	0.55
AB	47 (42.7)	32 (42.6)			
BB	7 (6.4)	8 (10.6)			
<b>EPHX1 exó4</b>					
AA	73 (65.8)	54 (72.0)	3.57	2	0.17
AB	37 (33.2)	18 (24.0)			
BB	1 (1)	3 (4.0)			
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>					
AA	73 (65.8)	54 (72.0)	0.80	1	0.37
AB+BB	38 (34.2)	21 (28.0)			
<b>Activitat mEH</b>					
Alta	23 (20.9)	12 (16.0)	1.04	2	0.59
Intermèdia	47 (42.7)	31 (41.3)			
Baixa	40 (36.4)	32 (42.7)			

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

Taula 15.11. OR ajustades associades als genotips en la població fumadora d'igual o més de 50PY.

Genotips	OR ajustada	IC (95%)
<b>GSTM1</b>		
Positiu	1	
Nul	1.06	0.57-1.97
<b>GSTM1</b>		
Nul	1	
A	1.01	0.51-2.11
AB	0.69	0.15-3.11
B	0.82	0.32-2.09
<b>GSTM1</b>		
Nul	1	
A	1.04	0.51-2.11
AB+B	0.79	0.34-1.82
<b>GSTT1</b>		
Positiu	1	
Nul	0.64	0.29-1.04
<b>GSTM3<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	1.1	0.56-2.18
<b>GSTP1</b>		
AA	1	
AB	0.89	0.46-1.75
BB	0.96	0.34-2.71
<b>EPHX1 exó3</b>		
AA	1	
AB	0.84	0.43-1.61
BB	0.43	0.13-1.4
<b>EPHX1 exó4<sup>a</sup></b>		
AA	1	
AB+BB	1.36	0.69-2.66
<b>Activitat mEH</b>		
Alta	1.71	0.71-4.15
Intermèdia	1.38	0.69-2.76
Baixa	1	

(a) S'han agrupat els heterozigots i els homozigots de l'al·lel variant per tal de realitzar els càlculs

## **VI. DISCUSSIÓ**



## 16. MÈTODES I FREQUÈNCIES

A final dels anys 90 es va iniciar un estudi de la susceptibilitat genètica als carcinògens mediambientals a nivell internacional (GSEC) amb un elevat nombre d'investigadors participant en aquest projecte (Taioli, 1999). Els estudis publicats fins a les hores tenien poc poder per detectar associació entre els polimorfismes i una determinada malaltia degut al reduït nombre de casos i controls. El primer que es va fer va ser crear una base de dades amb les freqüències dels polimorfismes més estudiats en les poblacions control (Garte et al., 2001). Aquestes freqüències poden ser utilitzades com a control de qualitat per estudis amb un nombre d'individus més petit, en aquest sentit les freqüències dels nostres estudis dels polimorfismes GSTM1, GSTT1, EPHX1 exó4 i exó3 estan d'acord amb les freqüències publicades pel GSEC, validant d'aquesta manera els mètodes de laboratori utilitzats.

### 16.1. MÈTODES

#### 16.1.1. MÈTODE D'ESTUDI DEL POLIMORFISME DEL GEN GSTM3

S'han estudiat els casos i els controls pel mètode A (Inskip et al., 1995) i pel mètode B. Donat que el resultat obtingut pels dos mètodes ha estat el mateix i que les freqüències obtingudes estan d'acord amb d'altres publicades en població caucàsica, es pot validar el mètode B per l'estudi del polimorfisme GSTM3.

El mètode B és un mètode de lectura ràpida dels al·lels i sense cap mena de confusió ja que l'elevada resolució de l'acrilamida permet diferenciar perfectament els 3pb entre els dos al·lels i els genotips AA, AB i BB s'identifiquen amb molta claredat, en canvi en el mètode A si la resolució del gel d'agarosa no és massa bona dificulta moltíssim la lectura i encara que ho sigui no sempre estan tant clars els genotips. A més el mètode B té l'avantatge que no cal purificar el producte de PCR ni s'ha de fer una reacció de restricció.

### **16.1.2. MÈTODES D'ESTUDI DELS POLIMORFISMES DELS GENS GSTP1 I EPHX1 A L'EXÓ 4**

Els mètodes PCR-RPLP utilitzats per l'estudi d'aquests dos gens polimòrfics GSTP1 i EPHX1 exó4 amb els enzims *Alw26I* i *RsaI* respectivament, descrits per Harries et al. pel que fa a GSTP1, i per Smith et al. el de l'EPHX1 exó4, proporcionen uns resultats clars i reproduïbles i els fan molt adients per l'estudi d'aquests polimorfismes (Harries et al., 1997; Smith & Harrison, 1997).

### **16.1.3. MÈTODE D'ESTUDI DEL POLIMORFISME DEL GEN EPHX1 A L'EXÓ3**

L'elevada heterogeneïtat de freqüències, genotípiques i al·lèliques, d'aquest polimorfisme publicades a la literatura podria ser deguda al gran nombre de mètodes emprats pel seu estudi. No tots els mètodes donen la mateixa fiabilitat de resultats, com és el cas del mètode A (PCR-RFLP) i mètode B (AS-PCR) emprat per nosaltres. En estudiar el grup de fumadors control i el grup dels malalts de càncer de pulmó pel mètode A es van obtenir unes freqüències en els controls que no es trobaven en equilibri de Hardy-Weinberg. Se sap que ha d'existir l'equilibri en les poblacions que no tenen la malaltia, en el cas dels malalts si aquests no estiguessin en equilibri podria indicar que possiblement el genotip del gen estudiat està relacionat amb la susceptibilitat de la malaltia, però no és el cas. Per tal de confirmar els resultats obtinguts en els fumadors control pel mètode A es va estudiar un segon grup control, una mostra de població general catalana. Els resultats d'aquest segon grup control van ser unes freqüències que tampoc es trobaven en equilibri de Hardy-Weinberg. Es va tornar a fer l'estudi dels controls pel mètode B i el resultat van ser unes freqüències semblants entre els dos grups control i en equilibri de Hardy-Weinberg. Es considera que dels dos mètodes el més correcte és el mètode B (les freqüències genètiques dels controls obtingudes per aquest mètode estan en equilibri de Hardy-Weinberg i d'acord amb les publicades pel GSEC), hi ha una sobreestimació de la freqüència genotípica dels individus homozigots mutants si s'estudia pel mètode A. L'any 2000 Yoshikawa et al. han publicat un treball on descriuen un nou polimorfisme al codó 119 AAG (Iys). Existeix una transició G→A que esdevé silent, ja que el nou

codó AAA també és lisina (Yoshikawa et al., 2000). Aquest nou polimorfisme es troba a la zona d'unió de l'oligonucleòtid EPO 2 de la PCR descrit per Smith i Harrison (Smith & Harrison, 1997).

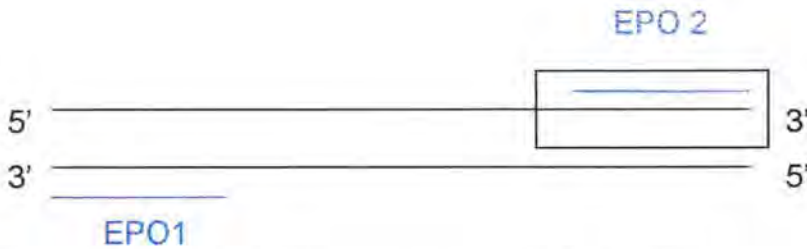


Fig. 16.1. Zona d'unió dels oligonucleòtids EPO 1 i EPO 2.

Si s'amplia la zona marcada de la figura 16.1. a la figura 16.2. s'observa l'ADN patró (amb els polimorfismes als codons 113 i 119) i l'oligonucleòtid EPO2 que genera una diana de restricció per l'enzim *EcoRV* en el cas de l'al·lel Tyr113 (5'-GATATC-3'). Si al codó 113 es troba la C no existeix diana per l'enzim, ja que la nova cadena sintetitzada serà 5'-GATGTC-3'.

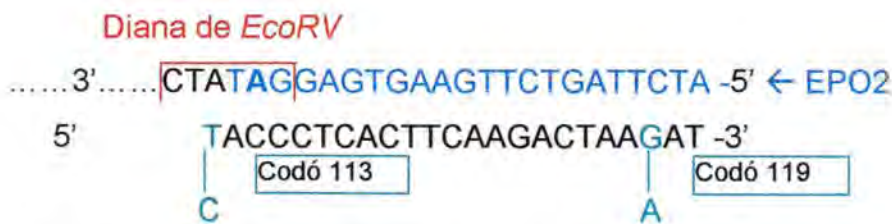


Fig. 16.2. Ampliació de la zona d'unió de l'oligonucleòtid EPO 2.

Els resultats d'aquest treball (Yoshikawa et al., 2001) indiquen que els al·lells His113 són, tots menys un (311:1), salvatges pel codó 119. El que implicaria l'existència d'un important desequilibri de lligament entre aquests dos al·lells. Els individus salvatges pel codó 113 (Tyr113) són en un 50% també salvatges pel codó 119, i l'altre 50% són mutants.

Segons els autors del treball anterior (Yoshikawa et al., 2001) i d'un nou treball també japonès (Keicho et al., 2001) si s'utilitzen per a la PCR els oligonucleòtids EPO1 i EPO2, l'al·lel que té la variant del codó 113 s'amplifica preferencialment quan a l'altre al·lel al codó 119 té la substitució G→A. Com a conseqüència d'aquest protocol amb els oligonucleòtids EPO1 o EPO2, sense l'anàlisi de la seqüència, la meitat dels heterozigots (AB) pel polimorfisme del codó 113 podrien ser classificats erròniament com a mutants homozigots (BB).

S'aplica ara aquest raonament a l'anàlisi dels nostres resultats obtinguts amb el mètode A, suposant també que l'oligonucleòtid EPO2 hibrida millor amb l'ADN patró si aquest té l'al·lel salvatge pel codó 119. Els individus homozigots Tyr113/Tyr113 estan ben classificats com a tal, perquè malgrat que pot existir amplificació preferencial de l'al·lel que porti la variant 119 sempre veurem amplificació. En el cas dels heterozigots Tyr113/His113 és més complicat, l'al·lel His113 segurament serà salvatge pel codó 119 i per tant s'amplificarà; l'al·lel Tyr113 podrà ser mutant o salvatge pel codó 119 amb un 50% de possibilitats per cadascun, així si és salvatge 119 s'amplificarà també i l'individu serà classificat correctament com a heterozigot 113, però si l'al·lel Tyr113 és mutant 119 no s'amplificarà i l'individu serà classificat com a homozigot His113/His113. Els individus classificats com a His113/His113 són correctes ja probablement seran salvatges 119 i no tindran problema per amplificar-se, cal tenir en compte però que molts individus His113/His113 en realitat són Tyr113/His113. El problema està en l'estudi dels heterozigots que en un 50% de vegades estaran classificats erròniament com a homozigots BB.

De fet aquesta hipòtesi dels treballs japonesos es confirma en part en els nostres resultats, ja que si s'estudien les poblacions pel mètode B s'observa que la freqüència dels individus Tyr113/Tyr113 no varia respecte de la mètode A, per tant estaven ben classificats, en canvi si que existeix variació en les freqüències dels heterozigots Tyr113/His113 i dels homozigots His113/His113. Els nostres resultats no confirmen la freqüència del 50% de la variant 119 en el cas de l'al·lel Tyr113, ja que els heterozigots classificats erròniament com a homozigots mutants no representen el 50% de tots els heterozigots classificats bé. El que s'observa és que



aproximadament el 50% dels individus homozigots His113/His113 pel mètode A són en realitat heterozigots Tyr113/His113 pel mètode B. Això pot indicar que les freqüències del nou polimorfisme i el seu desequilibri de lligament poden variar en funció de la ètnia i en caucàsics ser diferent que en asiàtics. Una posterior seqüenciació dels al·lells podria esclarir tot aquest tema.

## 16.2. ESTUDI DE FREQÜÈNCIES

### 16.2.1. FREQÜÈNCIES POBLACIONALS

La interacció de diferents factors al llarg de l'evolució ha provocat l'existència de diferències estadísticament significatives entre les diferents ètnies pel que fa a les freqüències d'alguns dels polimorfismes estudiats. És el cas del polimorfisme GSTM1, la freqüència del genotip nul varia del 50% en població caucàsica fins a un 26% en africans (Garte et al., 2001), o a un 33% en la població de l'Índia (Sreelekha et al., 2001). També la freqüència del genotip nul del polimorfisme GSTT1 varia, en població caucàsica és aproximadament del 20% i en asiàtics per exemple és del 47% (Garte et al., 2001). Les freqüències genotípiques del polimorfisme EPHX1 en els exons 3 i 4 també presenten variació.

Aquests factors que intervenen al llarg de l'evolució poden ser les mutacions, la recombinació, la migració de diferents poblacions cap a una altra població amb freqüències gèniques diferents (així s'introdueixen gens d'una població en una altre) i l'atzar. També cal tenir en compte l'endogàmia que converteix la variació genètica de cada població en diferències entre poblacions. Per a la majoria de les poblacions s'assoleix un equilibri entre l'endogàmia, la mutació i la immigració.

Nebert proposa dues possibles explicacions pel fet de la variació de freqüències entre diferents poblacions: per una banda poden reflectir la diferent exposició als diferents aliments durant l'evolució, per exemple alguns al·lells que confereixen un avantatge evolucionari en persones exposades a algunes toxines dels aliments; i per una altre banda les diferències entre freqüències poden representar la selecció dels individus més resistents en base a la seva dotació genètica (Nebert, 1997).



Mitjançant la selecció natural dels genotips més favorables es produeixen canvis dirigits de les freqüències al·lèliques de cada població.

### 16.2.2. DESEQUILIBRI DE LLIGAMENT

El gen EPHX1 es troba situat en el cromosoma 1p11 i els gens GSTM1 i GSTM3 es troben en tàndem en el cromosoma 1p13.3: 5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3'. De totes les combinacions possibles entre els gens EPHX1 (exons 3 i 4) i els gens GSTM1 i GSTM3 només s'ha observat desequilibri de lligament en la combinació GSTM1 i GSTM3 sent negatiu en la resta de casos: GSTM1 i EPHX1 exó3, GSTM1 i EPHX1 exó4, GSTM3 i EPHX1 exó3, GSTM3 i EPHX1 exó4 i EPHX1 exó3 amb EPHX1 exó4.

Aquests resultats corroboren els obtinguts per Inskip et al. que van trobar desequilibri de lligament entre GSTM1\*A i GSTM3\*B en la població anglesa (Inskip et al., 1995). L'explicació més probable per aquest fet és que existeix tant poca distància entre els dos gens que al llarg de l'evolució no han tingut lloc gaires recombinacions, per tant aquests al·lèls podrien ser els que correspondrien als parentals ancestrals o bé a l'haplotip més freqüent.

El fet que no s'observi desequilibri de lligament entre al·lèls dels gens EPHX1 i GSTM1 ni entre al·lèls del gens EPHX1 i GSTM3 fa pensar que pot ser degut a que entre ells existeix ja una certa distància la qual ha permès que es doni el procés de recombinació en la meiosi durant l'evolució. El que resulta més sorprenent, degut a la poca distància que els separa, és el fet que entre l'exó3 i l'exó4 del mateix gen EPHX1 no s'hagi observat desequilibri de lligament.

De manera general cal tenir en compte que el nombre d'individus del nostre estudi és insuficient per poder afirmar que no existeix desequilibri de lligament entre dos al·lèls, ja que les freqüències de les combinacions entre alguns genotips eren tant baixes que han obligat a considerar els genotips AB i BB junts en molts casos. A més en el cas del polimorfisme GSTM1 existeix la limitació del mètode, ja que no es pot diferenciar entre GSTM1\*A/GSTM1\*A i GSTM1\*A/GSTM1\*0 ni entre

GSTM1\*B/GSTM1\*B i GSTM1\*A/GSTM1\*0. Per últim una altra limitació seria el fet que no s'ha pogut treballar amb haplotips.

## **17. ELS POLIMORFISMES DE LES GST I mEH I LA SEVA RELACIÓ AMB EL CÀNCER DE PULMÓ I DE LARINGE.**

Els gens que codifiquen pels enzims implicats en el metabolisme dels xenobiòtics formen part dels gens encarregats de la integritat genòmica juntament amb els de reparació de l'ADN entre d'altres. Si aquests gens presenten alguna disfunció poden augmentar les possibilitats de mutació en els gens encarregats de mantenir el control de la proliferació cel·lular i la replicació de l'ADN, afavorint així el procés cancerigen (Lai & Shields, 1999). L'estudi d'aquests gens és molt interessant des del punt de vista de la salut pública ja que malgrat la seva baixa penetrància, les variants al·lèliques són molt freqüents entre la població (a la inversa de gens com els supressors de tumors que tenen una elevada penetrància però molt baixa freqüència de mutació entre la població) el que fa que el risc associat a ells no sigui gens menyspreable (Bouchardy et al., 2001; Garte, 2001).

### **17.1. GSTM1**

Des de que Seidegard l'any 1985 va associar la deficiència en GSTM1-1 amb un increment del risc al càncer de pulmó s'han realitzat nombrosos estudis amb resultats molt contradictoris.

En els nostres resultats s'observa excés d'individus amb el genotip GSTM1 nul entre els malalts de càncer de pulmó i d'individus GSTM1 positiu entre els controls (malgrat que aquestes diferències no són estadísticament significatives); en l'estudi de càncer de laringe no s'observen aquestes diferències. Es pot pensar que l'efecte d'aquest polimorfisme en relació al càncer de pulmó i de laringe és diferent.

En l'estudi de les OR ajustades s'observa que el genotip nul pot estar associat amb un lleu augment de risc de càncer de pulmó OR=1,35 respecte al genotip positiu, malgrat que l'interval de confiança inclou el valor de 1 i per tant no és significatiu; en canvi no s'observa efecte en la modulació del risc de càncer de laringe ja que l'OR associada a aquest genotip és propera a 1. Si es divideixen els positius en positiu A, AB i B s'observa en l'estudi de càncer de pulmó un marcat efecte protector del genotip positiu AB respecte al genotip nul, en canvi aquest mateix genotip és el que representa el risc més elevat en el càncer de laringe tot i que l'OR de 1,6 no és significativa. En l'anàlisi on s'agrupen els positius AB i B s'observa que el genotip AB+B en relació al risc de càncer de pulmó té un efecte protector i quasi significatiu OR de 0,54 i interval de confiança de 0,29-1,02; en relació al càncer de laringe no s'observa efecte.

Els nostres resultats sobre el risc de càncer de pulmó estan d'acord amb els resultats obtinguts per McWilliams et al. (OR= 1,40 pel genotip nul) i amb el de d'Errico et al. (OR=1,32 pel genotip nul en caucàsics). També estan d'acord amb els de Houlston en un estudi sobre el càncer de pulmó, en el sentit que malgrat nosaltres obtenim una OR major que la que va obtenir ell (OR= 1,08 ; IC 95%= 0,97-1,22) no és significativa (McWilliams et al., 1995; d'Errico et al., 1996; Houlston, 1999).

De fet la GSTM1-1 s'expressa sobretot en fetge i poc en pulmó (Houlston, 1999) això podria explicar la poca relació amb la susceptibilitat al càncer de pulmó. A més existeix la possibilitat que el risc petit associat a un genotip concret sigui emmascarat per interaccions amb altres al·lels polimòrfics que codifiquen per altres enzims metabòlics. Per una altra banda el risc associat a GSTM1 es pot explicar per l'important paper del fetge en el metabolisme dels compostos la via d'entrada dels quals ha estat el pulmó. El pulmó està exposat als carcinògens tant per la part del lumen com per la part de la sang per la recirculació dels metabòlits des del fetge (Ryberg et al., 1997).

El fet que el genotip que comporta un risc menor en l'estudi del càncer de pulmó sigui el positiu AB podria ser degut a que és l'únic que assegura que no hi ha cap al·lel nul, ja que pel mètode d'anàlisi emprat no és possible saber exactament si el

genotip positiu A és GSTM1\*A/GSTM1\*A o GSTM1\*A/GSTM1\*0, ni el B si és GSTM1\*B/GSTM1\*B GSTM1\*B/GSTM1\*0; tenint en compte que posseir genotip nul, i per tant l'al·lel nul, comporta un augment de risc (no significatiu, però) respecte a posseir el genotip positiu.

Els resultats obtinguts en relació al risc de càncer de laringe no estan d'acord amb els publicats per Hanna et al. que troben una freqüència de delecció en els malalts de càncer de laringe del 80% i per tant una forta associació entre aquest genotip i el risc al càncer de laringe (Hanna et al., 2001). Tampoc estan d'acord amb els obtinguts per Lafuente et al. els quals afirmen que el genotip nul està relacionat amb el risc a la malaltia (OR=1,9, significativa; Lafuente et al., 1998). Jourenkova-Mironova et al. també troben una relació entre el genotip nul i el càncer de laringe (Jourenkova-Mironova et al., 1998b). Per tant els nostres resultats no confirmen els publicats amb anterioritat.

L'estudi en població masculina dóna uns resultats gairebé iguals a l'estudi en tota la població. Això és deu al fet de que existeix tant poca representació femenina, tant en el grup de controls com en els dos grups de casos, que les freqüències dels diferents genotips queden gairebé inalterades.

En l'estratificació en funció dels PY s'observa que l'efecte del genotip nul en relació al càncer de pulmó és més marcat en els individus que tenen igual o més de 50PY, ja que l'OR respecte al genotip positiu dels individus amb menys de 50PY és de 1,06 i la dels individus amb igual o més de 50PY és de 1,65, malgrat que no és significativa, superant fins i tot l'OR calculada per a tota la població. Aquests resultats estan d'acord amb els publicats per Brockmøller et al. i per Hirvonen et al. els quals malgrat que els límits de l'estratificació són diferents troben que a mesura que augmenten els PY augmenta també l'efecte del genotip nul (Brokmøller et al., 1993; Hirvonen et al., 1993). Els nostres resultats obtinguts en l'estratificació per PY s'han d'interpretar amb precaució ja que el nombre de casos i de controls no està compensat en els dos grups, en el grup de menys de 50PY existeixen molts més controls que casos, i en el cas d'igual o més de 50PY passa al contrari. A més les



dades dels PY les han aportat els propis malalts o els participants del programa de deshabitació, amb la subjectivitat que això comporta.

## 17.2. GSTT1

El gen GSTT1 codifica per la proteïna GSTT1-1 que és un homodímer. Existeixen dos possibles al·lels, l'al·lel nul o GSTT1\*0 i l'al·lel positiu o GSTT1\*1. En el nostre estudi pel mètode analític que s'ha emprat només es pot distingir entre genotip positiu i genotip negatiu, no es poden saber els heterozigots GSTT1\*0/GSTT1\*1.

No s'han trobat diferències significatives pel que fa a la freqüència del genotip nul entre els casos i els controls, ni en el càncer de pulmó ni en el de laringe. Quan es calculen les OR ajustades associades al genotip nul respecte al genotip positiu el resultat és que el genotip nul no modula la susceptibilitat al càncer de pulmó (OR=0,95, IC 95%=0,56-1,61), mentre que esdevé un factor protector pel que fa al risc de càncer de laringe (OR=0,58, IC 95%=0,33-0,99). Aquests resultats no confirmen els trobats per Hanna et al. ni per Jourenkova-Mironova et al. en uns estudis sobre el càncer de laringe (Jourenkova-Mironova et al., 1998b; Hanna et al., 2001). Sí que confirmen els de Deakin et al. pel càncer de pulmó (OR=1,15, IC 95%=0,56-2,36) (Deakin et al., 1996).

Els possibles substrats per GSTT1-1 entre els components del fum del tabac no han estat totalment identificats, alguns d'ells sí que es coneixen com l'òxid d'etilè (classificat per la IARC com a carcinogen humà i un menor component del fum del tabac). És possible però que la GSTT1-1 no estigui involucrada en la biotransformació dels majors carcinògens presents en el fum del tabac coneguts fins ara, per exemple els HPA són un substrat poc important per aquests enzims (Landi, 2000), el que explicaria que aquest polimorfisme no estigués implicat en el risc de càncer de pulmó. També és possible que intervingui en la bioactivació d'algun carcinogen important per l'etiologia del càncer de laringe.

L'estudi en la població masculina ha donat resultats similars als anteriors pels mateixos motius que els esmentats pel polimorfisme del gen GSTM1.



L'estratificació en funció dels PY en relació al risc de càncer de laringe no afecta als resultats, en canvi en el càncer de pulmó es veu una relació més important entre el genotip nul i el risc a mesura que augmenta el consum de tabac, malgrat que no és significativa.

### 17.3. GSTM3

Els resultats obtinguts de l'estudi d'aquest polimorfisme fan arribar a la conclusió que per si sol no modula el risc ni de càncer de pulmó ni el de laringe. Aquesta observació està d'acord amb la publicada per Jourenkova-Mironova et al. en un estudi sobre el càncer de pulmó i amb la publicada per Saarikoski et al., no troben relació entre aquest polimorfisme i el risc de càncer de pulmó (Jourenkova-Mironova et al., 1998a; Saarikoski et al., 1998). Els nostres resultats estan, però, en desacord amb els publicats per Jourenkova-Mironova et al. que troben una OR ajustada de 2 (IC 95%=1,1-3,4) pels genotip AB+BB respecte al genotip AA en el càncer de laringe (Jourenkova-Mironova et al., 1999).

El fet que el genotip GSTM3\*B/GSTM3\*B en el cas del càncer de pulmó estigui més representat entre els controls que entre els casos, amb una freqüència gairebé del doble, fa pensar en un possible efecte protector de l'al·lel GSTM3\*B, la seva OR ajustada respecte al genotip GSTM3\*A/GSTM3\*A és de 0,75 però no és significativa ja que el seu interval de confiança és de 0,16-3,43. No s'observa aquest possible efecte protector en l'estudi del càncer de laringe.

Es va postular la hipòtesi que la delecció de 3pb situada a l'intró 6 de l'al·lel GSTM3\*B donava lloc a un motiu de reconeixement del factor de transcripció negatiu YY1 (Inskip et al., 1995). Més tard altres autors van afirmar que YY1 era un factor de transcripció positiu (Hayes & Strange, 2000). En un treball realitzat pel nostre grup (To-Figueras et al., 1999) es va estudiar el motiu de reconeixement del factor de transcripció YY1, es trobava als nucleòtids 2-12 de l'intró 6, la delecció de 3pb de l'al·lel GSTM3\*B es troba situada en els nucleòtids 22-24 de la seqüència de l'al·lel GSTM3\*A, i per tant aquesta delecció no afecta al lloc d'unió de YY1. Proper a la delecció es troba un possible motiu de reconeixement del factor de transcripció

HSF1 el qual activa la transcripció dels gens als que s'uneix, aquest motiu es troba en els dos al·lels però la delecció podria afectar a l'afinitat d'unió. També es troba un altre motiu de reconeixement pel factor de transcripció NF-GMa el qual només es troba a l'al·lel GSTM3\*B. Malgrat tot el paper de la delecció de 3pb encara roman incerta.

En l'estudi de la població masculina els resultats obtinguts són similars als obtinguts en l'estudi de tota la població, tant per l'estudi del càncer de pulmó com pel de laringe.

Quan fem l'estratificació per nombre de PY en l'estudi del càncer de pulmó s'observa que el possible efecte protector de l'al·lel GSTM3\*B es va perdent a mesura que augmenten el nombre de PY, en el cas de menys de 50PY l'OR ajustada associada al genotip GSTM3\*B/GSTM3\*B és de 0,39 (IC 95%=0,04-3,67) en canvi si el nombre de PY és igual o superior a 50PY l'OR ajustada es situa al voltant de 1. En l'estudi del càncer de laringe l'estratificació per nombre de PY no modifica els resultats obtinguts, el que no està d'acord amb Jourenkova-Mironova et al. ja que troben una disminució del risc associat a GSTM3\*AB o BB en augmentar el consum de tabac (Jourenkova-Mironova et al., 1999).

## 17.4. GSTP1

Els nostres resultats indiquen que no existeix cap relació entre aquest polimorfisme i el risc al càncer de pulmó o de laringe quan es considera la totalitat de les mostres, en ambdós casos les OR ajustades són properes a 1. Aquestes observacions estan d'acord amb les realitzades en dos estudis de càncer de pulmó (Jourenkova-Mironova et al. 1998a; Harris et al., 1998) i amb les realitzades en un estudi sobre el risc de càncer de laringe (Jourenkova-Mironova et al., 1999). Harries et al. però van trobar un increment del risc de càncer de pulmó associat a l'al·lel GSTP1\*B (OR=1,9) malgrat que no era significatiu. Ryberg et al. van observar un augment dels adductes en l'ADN en els individus amb el genotip GSTP1\*B/GSTP1\*B (Harries et al., 1997; Ryberg et al., 1997).

La GSTP1-1 està àmpliament expressada en teixit epitelial humà normal, i és particularment abundant en pulmó, esòfag i placenta (Watson et al., 1998). Donat que el residu 105 es troba a prop del centre actiu de l'enzim es va pensar que el seu polimorfisme podria afectar a la capacitat catalítica de l'enzim, diversos autors van confirmar aquesta sospita. Es va observar que els enzims que contenen valina a la posició 105 són en principi set vegades més eficients en la metabolització del BPDE que els enzims que contenen isoleucina, en canvi són tres vegades menys eficients en la metabolització del 1-clor-2,4-dinitrobenzè (CDNB) (Hayes & Strange, 2000). S'ha postulat per tant que els individus amb GSTP1b-1b podrien ser menys susceptibles als efectes carcinògens del benzo[a]pirè (Saarikoski et al., 1998). Els nostres resultats considerant únicament aquest polimorfisme, sense possibles combinacions amb d'altres no confirmen aquesta hipòtesi.

Els resultats trobats en població masculina són similars als de l'estudi en tota la població.

En estratificar els grups en funció del nombre de PY es van observar diferències considerables en relació al risc de càncer de pulmó. El risc augmenta en disminuir el consum de tabac, així amb un consum superior o igual a 50 PY el risc no es modifica per aquest polimorfisme però en considerar el consum menor de 50PY s'observa que el genotip GSTP1\*B/GSTP1\*B comportava un risc tres vegades més gran que el genotip GSTP1\*A/GSTP1\*A. Els grups queden molt descompensats quan es fa l'estratificació per PY de manera que en considerar els iguals o majors de 50PY tenim 112 malalts de càncer de pulmó i només 74 controls, i en considerar els menors de 50PY tenim 65 malalts de càncer de pulmó i 127 controls. Per tant estudis amb un nombre més gran d'individus per cadascun dels grups i més compensats serien bons per esclarir el tema.

En considerar el risc al càncer de laringe no s'observa cap efecte del consum de tabac, el que està d'acord amb el publicat per Jourenkova-Mironova et al. (Jourenkova-Mironova et al., 1999).

## 17.5. EPHX1 EXÓ 3 I EXÓ 4 I ACTIVITAT DE LA mEH

S'ha postulat que la variant en l'exó 3 dóna lloc a una activitat *in vitro* de l'enzim menor i la variant de l'exó 4 major respecte al genotip salvatge (Hasset et al., 1994a). Si tenim en compte que la mEH, malgrat que en principi és un enzim que pot desactivar els epòxids generats per l'acció del citocrom P450 i donar lloc a dihidrodriols (menys reactius que els anteriors), juga un important paper en l'activació del benzo[a]pirè, es pot suposar que com més disminuïda tingui la seva activitat més lent serà el procés de generació de BPDE i per tant el risc al càncer disminuirà.

S'observa una freqüència més elevada del genotip AA en els casos que en els controls, per tant l'al·lel Tyr113 podria estar relacionat amb la susceptibilitat a la malaltia. En calcular el risc associat als diferents genotips es va observar un efecte protector de l'al·lel His113 respecte a l'al·lel Tyr113 tant en l'estudi del risc a càncer de pulmó, com el de laringe, no significatiu, però, estadísticament. En canvi no s'observà cap efecte sobre la modulació del risc de càncer de pulmó o de laringe pel polimorfisme en l'exó 4. S'hauria esperat que la variant Arg139 en donar lloc a un enzim amb més alta activitat tingués associat un risc major que el genotip salvatge. Els resultats obtinguts indiquen que els polimorfismes al gen EPHX1 per si sols no estan relacionats amb la susceptibilitat al càncer.

Aquests resultats estan d'acord amb els resultats obtinguts per Jourenkova-Mironova et al. en un estudi de càncer de laringe en caucàsics, que troben una OR ajustada associada al genotip His113/His113 de 0,5 (IC 95%=0,2-1,1), i una OR ajustada de 1 (IC 95%=0,6-1,8) per la combinació de genotips His139/Arg139 i Arg139/Arg139 respecte al genotip salvatge en tots els casos (Jourenkova-Mironova et al., 2000). També estan d'acord amb Benhamou et al. en un estudi realitzat en caucàsics sobre el risc de càncer de pulmó, troben una OR ajustada associada al genotip His113/His113 de 0,53 (IC 95%=0,28-1,03) i a la combinació de genotips His139/Arg139 i Arg139/Arg139 una OR ajustada de 1,29 (IC 95%=0,80-2,08) respecte als genotips salvatges en tots els casos (Benhamou et al., 1998). Smith i Harrison en un estudi de càncer de pulmó en caucàsics, troben una OR de 1,6 (IC 95%=0,6-4,8) associada al genotip His113/His113, i una OR de 1,4 (IC 95%=0,1-



13,3) associada al genotip Arg139/Arg139 respecte a l'homozigot salvatge en ambdós casos (Smith & Harrison, 1997). London et al. a la població caucàsica de Los Angeles en relació al càncer de pulmó no troben un efecte protector associat al genotip His113/His113 (OR=0.99, IC 95%=0.46-2.14), i troben una mica d'efecte protector associat al genotip Arg139/Arg139 (OR=0,63, IC 95%= 0,23-1,77) (London et al., 2000). Els mètodes d'estudi dels polimorfismes emprats per Smith i Harrison i per London et al. són diferents de l'emprat per nosaltres i com ja s'ha comentat aquest fet és una de les possibles causes de la heterogeneïtat de freqüències genotípiques i al·lèliques obtingudes i per tant de les OR ajustades associades als diferents genotips, malgrat que cap d'elles ni de les nostres és significativa estadísticament.

En l'anàlisi de la població masculina dels polimorfismes en els exons 3 i 4 del gen EPHX1 no s'observen diferències importants ni en el polimorfisme de l'exó 3 ni en el de l'exó 4 tant per l'estudi del càncer de pulmó com pel de laringe.

Si s'estratifica per nombre de PY els resultats del polimorfisme a l'exó 3 no varien en funció dels PY en el càncer de pulmó, però en el càncer de laringe s'observa que pels fumadors de menys de 50PY desapareix aquest possible efecte protector del genotip His113/His113. En el polimorfisme de l'exó 4 no s'observen diferències importants en la modulació del risc ni de càncer de pulmó ni de càncer de laringe en funció dels PY.

Pel que fa a la relació de l'activitat de la mEH predita genèticament i el risc de càncer de pulmó o de laringe, s'ha trobat que l'activitat alta i intermèdia comporten un risc més gran que l'activitat baixa, malgrat que aquest risc no és significatiu. Això està d'acord amb el fet que com més elevada sigui l'activitat de l'enzim més ràpid serà el procés de bioactivació del benzo[a]pirè i per tant s'augmenta el risc de la formació d'adductes amb l'ADN.

Jourenkova-Mironova et al. han trobat un risc significatiu en l'activitat alta (OR=2,4, IC 95%=1,1-5,1) i intermèdia (OR= 1,7, IC 95%=1,0-3,1) en relació al càncer de laringe (Jourenkova-Mironova et al., 2000). Benhamou et al. van observar un risc



elevat per l'activitat intermèdia (OR= 1,68, IC 95%=1,01-2,78) i per l'alta (OR=2,66, IC 95%=1,39-5,07) en relació al càncer de pulmó (Benhamou et al., 1998). En ambdós treballs s'ha trobat una associació més forta entre l'activitat de la mEH i el risc al càncer de pulmó o laringe que l'observada per nosaltres, cal dir que el nombre d'individus en el nostre estudi és superior al dels dos estudi anteriors, tant pel que fa als casos com pel que fa als controls i aquest podria ser un factor que expliqués la variació de resultats. En aquests estudis, així com en el nostre l'activitat de la mEH s'ha predit a partir del genotip dels polimorfismes a l'exó 3 i 4, però cal tenir en compte que els polimorfismes descrits a la regió reguladora 5' també afecten a les propietats catalítiques de l'enzim (Raaka et al., 1998) així com d'altres factors, pel que la relació genotip-fenotip de la mEH considerant només els polimorfismes en els exons 3 i 4 del gen és una aproximació ja que la realitat d'aquesta relació no està ben establerta encara.

No existeixen diferències en els resultats en considerar només la població masculina.

No s'observa modificació del risc en estratificar per consum de tabac ni pel càncer de pulmó ni pel de laringe, el que està d'acord amb Benhamou et al. (Benhamou et al., 1998).

## 17.6. COMBINACIÓ DE POLIMORFISMES

Donat que en el metabolisme dels xenobiòtics intervenen més d'un enzim, cal valorar com influeixen combinacions de diferents polimorfismes en la susceptibilitat al càncer de pulmó i de laringe. Les combinacions que s'han fet han estat en principi combinacions amb els al·lels que tenien un risc més elevat de cadascun dels gens, o bé combinacions ja descrites a la literatura.

En les combinacions amb GSTM1 com a categoria de referència s'ha considerat la combinació amb GSTM1 positiu, així s'obté el resultat de l'OR ajustada associada al genotip GSTM1 nul i l'al·lel de risc, per veure si el fet de tenir GSTM1nul potencia el risc de l'al·lel i viceversa.

La hipòtesi de que en principi l'absència de GSTM1-1 podria ser compensada per altres GSTs, i en ser aquestes codificades pels seus al·lells de risc la protecció no seria tant eficient i augmentaria el risc de càncer de pulmó i de laringe no es confirma en els nostres resultats, ja que cap de les combinacions porta associat un risc significatiu ni al càncer de pulmó ni al de laringe, el que està en desacord amb el publicat pel càncer de pulmó per Bouchardy et al. que afirmen que el risc associat als al·lells de risc dels polimorfismes GSTM3 i GSTP1 augmenta en absència de GSTM1 (Bouchardy et al., 2001). També estan en desacord amb Jourenkova-Mironova et al. que afirmen que el risc de càncer de laringe associat als genotips de GSTM3 augmenta en absència de GSTM1 (Jourenkova-Mironova et al., 1999). Alguns autors havien descrit que l'associació entre les dues deleccions als gens GSTM1 i GSTT1 era un factor de risc pel càncer de pulmó i pel de laringe (Saarikoski et al., 1998; Hong et al., 2000; Landi, 2000) el que tampoc es confirma en els nostres resultats. S'observa en l'estudi del càncer de pulmó un efecte protector i significatiu per a la combinació GSTM1AB+B i GSTT1 positiu que es podria explicar pel genotip GSTM1AB+B més que pel GSTT1 positiu.

En estudiar les OR ajustades de les combinacions entre els polimorfismes de les GST (enzim de fase I) i els de la mEH (enzim de fase II) l'única combinació amb resultats estadísticament significatius ha estat la combinació entre els polimorfismes GSTP1 i EPHX1 a l'exó3. S'observa un augment de risc de càncer de pulmó (OR=2.29, IC 95%=1.19-4.41) associat a la combinació de genotips GSTP1AA i EPHX1 exó3AA respecte de GSTP1AA/EPHX1 exó3AB+BB que és la categoria de menor risc. En l'estudi de càncer de laringe l'augment del risc es troba associat als genotips GSTP1AA/EPHX1 exó3AA i GSTP1AB+BB/EPHX1 exó3AA amb la mateixa intensitat, OR=1.83 i OR=1.84 respectivament, malgrat que les dues són quasi significatives. Segons alguns autors la variant al·lèlica EPHX1 Tyr113 presenta una activitat major que la variant His113, per tant serà un enzim més eficient hidratant als epòxids generats pel citocrom p450, però també formarà de manera més ràpida al benzo[a]pirè-7,8-dihidrodiol que mitjançant l'acció novament del citocrom P450 es transformarà en el BPDE. El BPDE pot ser inactivat per conjugació amb glutatió, reacció catalitzada entre d'altres isoenzims per la GSTP1-1, la qual en funció de

l'aminoàcid al codó 105 podria presentar diferents propietats catalítiques, de manera que la variant GSTP1\*A (Val105) és menys eficient en la conjugació que la variant GSTP1\*B (Ile105). Per tant si per una banda la generació de BPDE és més ràpida i per una altra la seva inactivació més lenta el risc de càncer augmenta.

En l'estudi de les combinacions entre l'activitat de la mEH predita genèticament i els genotips de presumiblement major risc dels polimorfismes de les GST el resultat és que s'observa un risc elevat i significatiu associat a la combinació activitat alta i GSTP1 AA, tant pel cas del càncer de pulmó com pel de laringe, respecte a l'activitat baixa i GSTP1AA. En l'estudi del càncer de pulmó també s'observa un augment de risc, significatiu per a la combinació d'activitat intermèdia i GSTP1AA. L'explicació és la mateixa que abans, l'únic que ara també s'està considerant l'efecte del polimorfisme a l'exó 4 del gen EPHX1, ja que l'activitat de la mEH estava predita genèticament a partir dels polimorfismes en els exons 3 i 4 del gen EPHX1.

## 17.7. CONSIDERACIONS FINALS

Donada la complexitat del procés de carcinogènesi és possible que determinades associacions entre combinacions gèniques i augment de risc no puguin ser detectades per estudis d'epidemiologia molecular amb un nombre petit o fins i tot mitjà de mostres. Aquest podria ser el nostre cas. L'absència de riscos significatius trobats en estudis amb un nombre de mostres limitades no significa necessàriament que l'associació no existeixi. Gràcies a l'esforç de molts laboratoris s'està realitzant un projecte comú d'estudi dels polimorfismes metabòlics (GSEC), un meta-anàlisi, i així aconseguir un nombre d'individus analitzats gran que permetin extreure conclusions més sòlides. Els nostres estudis s'inclouen en aquest projecte.

Els polimorfismes genètics dels enzims metabòlics poden modificar la dosi efectiva final del carcinogen, són per tant possibles factors moduladors dels efectes carcinogènics. La interpretació des del punt de vista bioquímic dels resultats obtinguts del seu estudi en relació al risc de càncer no és gens fàcil ja que cal tenir en compte que:

- L'organisme està exposat a un elevat nombre de carcinògens per diferents fonts: medi ambient, fum del tabac, aliments, medi laboral etc. (Lai & Shields, 1999).
- Suposant que un únic carcinogen fos el causant d'un determinat tipus de càncer aquest podria ser metabolitzat per varies vies diferents donant lloc a una varietat de metabòlits, alguns actius i altres inactius. En principi, però, no hi ha un únic carcinògen responsable sinó varis, el fum del tabac per exemple ja és una barreja de molts compostos carcinògens.
- Un mateix enzim pot estar implicat en l'activació d'un carcinogen i en la desactivació d'un altre.
- En l'activitat enzimàtica influeixen, a banda dels factors genètics, d'altres factors.
- La dosi del carcinogen pot ser important per a la valoració del risc associat a un determinat polimorfisme.
- Existeix coincidència parcial de substrats en les GST, per exemple els HPA són substrat per GSTM1, GSTM3, GSTP1 i poc per GSTT1, però a banda dels HPA existeixen més compostos carcinògens metabolitzats per aquests enzims.
- Serà el balanç activació-desactivació de tots els productes carcinògens que arriben al nostre cos el que donarà o no lloc a l'inici del procés de carcinogènesi.

Els estudis d'epidemiologia molecular futurs en comptes de preguntar-se si un determinat polimorfisme constitueix un factor de risc per a un tipus de càncer, s'haurien de preguntar per a qui un determinat polimorfisme constitueix un factor de risc al càncer. El procés de carcinogènesi és un procés amb múltiples etapes en el que existeixen varies vies alternatives que poden estar influenciades per múltiples factors com l'edat, el sexe, els hàbits dietètics, el tabaquisme etc., de manera que un polimorfisme determinat podria esdevenir un factor de risc per a un tipus de càncer en individus, per exemple, d'un determinat sexe, edat i grau d'exposició al fum i en canvi no modular el risc en la resta de la població. Per això serà important considerar diferents subgrups entre els casos i entre els controls, el tamany dels quals ha de ser suficientment elevat com per a que els resultats obtinguts tinguin la potència adequada per poder valorar el risc (Garte, 2001).

## **VII. CONCLUSIONS**



## 18. CONCLUSIONS

**1-** El mètode d'estudi del polimorfisme GSTM3 per PCR i posterior electroforesi en poliacrilamida al 20% és un mètode fiable i reproduïble i comporta menys error d'interpretació dels resultats que el mètode per PCR-RFLP.

**2-** Existeix una gran heterogeneïtat en els mètodes d'estudi del polimorfisme EPHX1 a l'exó3 a la literatura i s'observen diferències entre les freqüències genotípiques i al·lèliques obtingudes pels diferents mètodes. S'han estudiat les nostres poblacions amb dos mètodes diferents, un mètode A (PCR-RFLP) i un mètode B (AS-PCR). Les freqüències de les poblacions control obtingudes amb el primer mètode no estaven en equilibri Hardy-Weinberg, en canvi sí ho estaven amb el segon mètode coincidint a més a més amb les publicades pel GSEC. Per tant, hem considerat el mètode AS-PCR més vàlid per l'estudi d'aquest polimorfisme.

**3-** Les freqüències relatives dels polimorfismes GSTM1, GSTT1, GSTM3, GSTP1, EPHX1 exó 3 i EPHX1 exó4 en la població control de fumadors sans són les següents:

- **GSTM1:**
  - Nul 49,2%
  - Positiu 50,8%
    - Positiu A 29,6%
    - Positiu AB 4,4%
    - Positiu B 16,7%
- **GSTT1:**
  - Nul 23,6%
  - Positiu 76,3%
- **GSTM3:**
  - AA 67,8%
  - AB 29,2%
  - BB 3,0%
- **GSTP1:**
  - AA 50,2%
  - AB 39,8%
  - BB 10,0%

- **EPHX1 exó3:** AA 45,8%  
AB 46,3%  
BB 7,9%
- **EPHX1 exó4:** AA 66,0%  
AB 30,5%  
BB 3,4%

Les freqüències gèniques dels polimorfismes GSTM3, GSTP1 i EPHX1 exons 3 i 4 es troben en equilibri de Hardy-Weinberg.

- 4- Les freqüències dels polimorfismes GSTM1, GSTT1, EPHX1 exó3 i EPHX1 exó4 estan d'acord amb les publicades en població caucàsica pel GSEC. Les freqüències dels polimorfismes GSTM3 i GSTP1 estan d'acord amb d'altres publicades en població caucàsica per aquests polimorfismes.
- 5- Les freqüències d'aquests polimorfismes varien en funció de les poblacions estudiades. S'han comparat les freqüències obtingudes per nosaltres amb d'altres freqüències de diferents poblacions publicades a la literatura i s'ha vist que les freqüències del polimorfisme GSTM1 presenten diferències estadísticament significatives amb les de la població africana i la de l'Índia; les del polimorfisme GSTT1 amb les de la població mexicoamericana i asiàtica; les del polimorfisme GSTP1 amb la població taiwanesa i afroamericana; les del polimorfisme EPHX1 exó3 amb les de la població afroamericana de Los Angeles i poblacions asiàtiques com els xinesos i els japonesos; i per últim les del polimorfisme EPHX1 exó4 amb les de la població xinesa.
- 6- Quan s'estudia el possible desequilibri de lligament entre els diferents al·lells dels gens GSTM1, GSTM3 i EPHX1 (exons 3 i 4), tots ells situats al cromosoma 1, únicament en el cas de la combinació entre GSTM1 i GSTM3 es pot rebutjar la hipòtesi de independència de les dues distribucions de freqüències ( $P < 0.01$ ). S'observa doncs desequilibri de lligament entre els al·lells GSTM1\*A i GSTM3\*B. La proximitat cromosòmica podria explicar aquest lligament.

En la resta de combinacions d'aquests gens no s'ha observat desequilibri de lligament.

**7-** Les distribucions de les freqüències de cadascun dels polimorfismes estudiats entre els controls i els malalts de càncer de pulmó i de laringe no presenten diferències estadísticament significatives.

Les OR ajustades associades a les variants de cadascun dels polimorfismes estudiats en relació al risc de càncer de pulmó són les següents (entre parèntesis s'indica l'interval de confiança del 95%):

GSTM1 nul: 1,35 (0,86-2,11)

GSTT1 nul: 0,95 (0,56-1,61)

GSTM3 AB+BB: 0,98 (0,60-1,59)

GSTP1 BB: 1,28 (0,60-2,72)

EPHX1 exó3 BB: 0,52 (0,20-1,33)

EPHX1 exó4 AB+BB: 1 (0,63-1,62)

Les OR ajustades en relació al càncer de laringe són les següents:

GSTM1 nul: 0,92 (0,59-1,43)

GSTT1 nul: 0,58 (0,33-0,99)

GSTM3 BB: 1,01 (0,26-3,98)

GSTP1 BB: 1,08 (0,50-2,33)

EPHX1 exó3 BB: 0,57 (0,23-1,37)

EPHX1 exó4 AB+BB: 0,98 (0,61-1,56)

En conseqüència no s'ha trobat que cap polimorfisme per si sol modifiqui significativament la susceptibilitat al càncer de laringe o de pulmó.

**8-** En estudiar l'activitat de la mEH predita genèticament a partir dels polimorfismes en els exons 3 i 4 del gen EPHX1, fent la classificació d'activitat baixa, intermèdia i alta, no s'observen diferències estadísticament significatives entre les distribucions de freqüències en el grup dels controls i en els dels malalts de càncer laringe i ni de pulmó. I per si sola no modula el risc de càncer ni de laringe ni de pulmó.

- 9-** De l'estudi separat de la població masculina no se'n desprèn cap diferència en relació al sexe.
- 10-** En valorar l'efecte d'aquests polimorfismes en la modulació del risc de càncer de pulmó i de laringe en funció de la dosi s'han considerat dos grups: individus que han estat exposats a menys de 50PY i individus que han estat exposats a igual o més de 50PY. Exceptuant el polimorfisme del gen GSTP1 no s'observa que l'efecte dels polimorfismes en el risc de càncer de pulmó i de laringe sigui modulats de manera significativa en funció de la interacció amb el tabac. El genotip GSTP1\*B/GSTP1\*B té una OR ajustada associada de 3,02 estadísticament significativa ja que el seu interval de confiança del 95% és de 1,01-9,01 en el cas d'individus exposats a menys de 50PY i no té cap efecte en els d'igual o més de 50PY.
- 11-** Els nostres resultats no confirmen la hipòtesi postulada per alguns autors els quals afirmaven que la combinació dels genotips GSTM1nul i GSTT1nul augmentava el risc de càncer de pulmó i de laringe, ja que la OR ajustada associada a aquesta combinació és de 0,72 (IC 95%= 0,27-1,92) pel càncer de pulmó i de 0,49 (IC 95%= 0,18-1,39) pel de laringe.
- 12-** L'única combinació entre els polimorfismes de les GST i mEH amb un risc significatiu ha estat la combinació GSTP1 i EPHX1 a l'exó3 ja que s'ha trobat una OR ajustada pel càncer de pulmó de 2,43 (IC 95%=1,27-4,66) associat al genotip GSTP1\*A/GSTP1\*A i EPHX1 Tyr113/Tyr113.
- En combinar l'activitat de l'epòxid hidrolasa, predita genèticament, amb els polimorfismes de les GST s'observa un risc elevat i estadísticament significatiu associat a la combinació activitat alta i GSTP1\*A/GSTP1\*A, tant pel càncer de pulmó (OR=2,83, IC95%= 1,05-7,64), com pel de laringe (OR=2,85, IC 95%= 1,11-7,35) respecte a l'activitat baixa en ambdós casos. A més pel que fa al risc de càncer de pulmó, també la combinació activitat intermèdia i GSTP1\*A/GSTP1\*A té una OR ajustada significativa: OR= 2,45, IC 95%= 1,17-

5,14. En la resta de combinacions amb altres GST no s'ha observat modulació del risc de càncer de pulmó ni de laringe.

**13-** Els resultats obtinguts per nosaltres i per altres autors no aconsellen una traducció i aplicació immediata en propostes de cribatge genètic preventiu en el camp de la salut pública. L'epidemiologia molecular és ara per ara un camp d'investigació obert pel futur amb nous enfocaments on s'estan integrant els esforços de nombrosos grups d'investigadors amb l'objectiu principal de la prevenció de malalties com el càncer.



## **VIII. BIBLIOGRAFIA**

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. *Biología Molecular de la Célula*. 3a edició. Omega. Barcelona. 1996.
- Alfonso, M. & Ibáñez, P. *El tabaco*. 1a edició. Mezquita. 1983.
- Anttila, S., Luostarinen L., Hirvonen, A., Elovaara, E., Karjalainen, A., Nurminen, T., Hayes, JD., Vainio, H. & Ketterer, B. (1995). Pulmonary expression of glutathione S-transferase M3 in lung cancer patients: association with GSTM1 polymorphism, smoking, and asbestos exposure. *Cancer Res.*, 55, 3305-3309.
- Armadan-Gil, L., Vaque-Rafart, J., Rosello, J., Olona, M. & Alseda, M. (1999). Cigarette smoking and male cancer risk with special regard to type of tobacco. *Int. J. Epidemiol.*, 28(4), 614-619.
- Ausubel, F. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene: Wiley- Interscience. New York. 1989.
- Barrallo, G. (1998). Efectos generales del consumo de tabaco sobre la salud y el rendimiento deportivo. En: *Tabaco, Salud y Juventud*. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco.
- Beaudet, A., Sainer, C., Sly, W. & Valle, D. (2001). Genetics biochemistry and molecular bases of variant human phenotypes. En: Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & Valle, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8a edició. McGraw-hill. NewYork. 3-45.
- Benhamou, E. & Benhamou, S. (1993). Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risc VI: lung cancer. *Eur. J. Cancer*, 29A (12), 1778-1780.
- Benhamou, S., Reinikainen, M., Bouchardy, C., Dayer, P., & Hirvonen, A. (1998). Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res.* 58, 5291-5293.
- Benninger, M.S. (1999). The impact of cigarette smoking and environmental tobacco smoke on nasal and sinus disease: a review of the literature. *Am. J. Rhinol.*, 13(6), 435-438.
- Blackburn, A., Woollatt, E., Sutherland, S.G. & Board, P.G. (1998). Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class

- glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase. *Cytogenet. Cell Genet.*, 83, 109-114.
- Blömeke, B. & Shields, P.G. (1999). Laboratory methods for the determination of genetic polymorphisms in humans. En: Vineis, P., Malalts, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J. & Boffeta, P. editors. *Metabolic polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 133-147.
  - Board, P., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L., Schulte, G., Danley, D., Hoth, L., Griffor, M., Kamath, A., Rosner, M., Chrnyk, B., Perregaux, D., Gabel, C., Geoghegan, K. & Pandit, J. (2000). Identification, characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases. *J. Biol. Chem.*, 275(32), 24798-24806.
  - Board, PG., Weber, GC. & Coggan, M. (1989). Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. *Ann. Hum. Genet.*, 53, 205-213.
  - Bolúmar, F. (2001). Estudios de casos y controles. En: Piédrola, G. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. 10a edició. Masson. Barcelona. 113-122.
  - Bönicke, R. & Reif, W. (1953). Enzymatic inactivation of isonicotinic acid hidrazide in humans and animals. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 220, 321-333.
  - Booth, J., Boyland, E. & Sims, P. (1961). An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochem. J.*, 79, 516-526.
  - Bouchardy, C., Benhamou, S., Jouenkova, N., Dayer, P. & Hirvonen, A. (2001). Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung Cancer*, 32, 109-112.
  - Brennan, P. (1999). Design and analysis issues in case-control studies adressing genetic susceptibility. En: Vineis, P., Malalts, N., Lang, M., d'Errico,A., Caporaso, N., Cuzick, J. & Boffeta, P. editors. *Metabolic polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 123-132.

- Brockmöller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Nitz, M. & Roots I. (1993). Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. *Cancer Res.*, 53, 1004-1011.
- Caeiro, J & Canabal, O. (1988). Aspectos genético-poblacionales. En: Huguet, E., Carracedo, A. & Gené, M. *Introducción a la investigación biológica de la paternidad*. Publicaciones del seminario Pere Mata. PPU. Barcelona.
- Cortessis, V., Siegmund, K., Chen, Q., Zhou, N., Diep, A., Frankl, H., Lee, E., Zhu, QS., Haile, R. & Levy, D. (2001). A case-control study of microsomal epoxide hydrolase, smoking meat consumption, glutathione S-transferase M3, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 61 (6), 2381-2385.
- d'Errico, A., Taioli, E., Chen, X. & Vineis, P. (1996). Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. *Biomarkers*, 1, 149-173.
- Deakin, M., Elder, J., Hemdrickse, C., Peckham, D., Baldwin, D., Pantin, C., Wild, N., Leopard, P., Bell, DA., Jones, P., Duncan, H., Brannigan, K., Aldersea, J., Fryer, AA. & Strange, RC. (1996). Glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cancer studies of interactions with GSTM1 in lung, oral, gastric and colorectal cancers. *Carcinogenesis*. 17 (4), 881-884.
- Denisenko, M., Pao, A., Tang, M. & Pfeifer, G. (1996). Preferential formation of benzo(a)pyrene adducts at lung cancer mutational hotspot in p53. *Science*, 274, 430-432.
- Doll, R. & Hill, A. (1950). Smoking and carcinoma of the lung. *Br. Med. J*, 30, 739-748.
- Eichelbaum, M., Spannbrucker, N., Steincke, B. & Dengler, H. (1979). Defective N-oxidation of sparteina in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 16(3), 183-187.
- Escarmís, C. *Ingeniería genética. Manual de técnicas básicas*. CSIC. Programa de Ingeniería Genética. Barcelona. 1985.

- Estapé, J., Agustí, A., Font, A., Salvador, T. & Viñolas, N. (1987). Tabaco y cáncer. *Med. Clin.*, 89, 30-37.
- Flórez, J. *Farmacología Humana*. 2ª Edició. Masson-Salvat. Barcelona. 1992.
- Freedman, A. (1999). Somatic alterations and metabolic polymorphisms. En: Vineis, P., Malalts, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J. & Boffeta, P. editors. *Metabolic polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 37-50.
- Fretland, A. & Omiecinski, C. (2000). Epoxide hydrolases: biochemistry and molecular biology. *Chem. Biol. Interact.*, 129, 41-59.
- Gaedigk, A., Leeder, JS. & Grant, DM. (1997). Tissue-specific expressing and alternative splicing of human microsomal epoxide hydrolase. *DNA Cell Biol.*, 16(11), 1257-1266.
- Garte, S. (2001). Metabolic susceptibility genes as cancer risk factors: time for reassessment?. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10, 1233-1237.
- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, AK., et al. (2001). Metabolic Gene Polymorphism Frequencies in Control Populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10, 1239-1248.
- Gené, M., Huguet, E. & Mezquita, C. (1991). Polimorfismo del ADN en la investigación biológica de la paternidad. Estado actual. *Med. Clin.*, 97, 110-114.
- Generalitat de Catalunya, Departament de Sanitat i Seguretat Social, Direcció General de Promoció de Salut. Col·lecció "Quaderns de salut", vol.8, *Manual de prevenció i de control del tabaquisme*. Secretaria General Tècnica del Departament de Sanitat i Seguretat Social. Barcelona. 1982
- Generalitat de Catalunya. Departament de Sanitat i Seguretat Social. <http://www.gencat.es/sanitat/>.
- Gestal, JJ. *Tabaco y Patología*. Col·lecció Medicina Galaica. Fundación Pedro Barrié de la Maza. La Coruña. 1988.
- Gisbert, JA. *Medicina Legal y Toxicología*. 5a edició. Masson. Barcelona Madrid. 1998.



- Gonzalez, F. & Kimura, S. (1999). Role of gene knockout mice in understanding the mechanisms of chemical toxicity and carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 143, 199-204.
- Gonzalez, F. & Kimura, S. (2001). Understanding the role of xenobiotic-metabolism in chemical carcinogenesis using gene knockout mice. *Mutat. Res.*, 477(1-2), 79-87.
- Griffiths, A., Miller, J., Suzuk, D., Lewontin, R. & Gelbart, W. *Genética*. 5a edición. McGraw-Hill, Interamericana. Madrid. 1995.
- Gsur, A., Haidinger, G., Hinteregger, S., Bernhofer, G., Schatzl, G., Madersbacher, S., Marberger, M., Vutuc, C. & Micksche, M. (2001). Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTP1, GSTM1 and GSTT1) and prostate-cancer risk. *Int. J. Cancer.*, 95(3), 152-155.
- Hand, P., Inskip, A., Gilford, J., Aldersea, J., Elexpuru-Camuruaga, J., Hayes, J., Jones, P., Strange, R. & Fryer, A. (1996). Allelism at the glutathione S-transferase GSTM3 locus: interactions with GSTM1 and GSTT1 as risk factors for astrocytoma. *Carcinogenesis*, 17 (9), 1919-1922.
- Hanna, E., MacLeod, S., Vural, E. & Lang, N. (2001). Genetic deletions of glutathione S-transferase as a risk factor in squamous cell carcinoma of the larynx: a preliminary report. *Am. J. Otolaryngol.*, 22(2), 121-123.
- Harries, L., Stubbins, M., Forman, D., Howard, G. & Wolf, C. (1997). Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*, 15(4), 641-644.
- Harris, MJ., Coggan, M., Langton, L., Wilson, SR. & Board, PG. (1998). Polymorphism of the Pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics*, 8(1), 27-31.
- Harrison, DJ., Hubbard, AL., MacMillan, J., Wyllie, AH., & Smith, CAD. (1999). Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and susceptibility to colon cancer. *Br. J. Cancer*, 79 (1),168-171.

- Hasset, C., Aicher, L., Sidhu, J. & Omiecinski, C. (1994a). Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphisms and functional expression in vitro of amino acid variant. *Hum. Mol. Genet.*, 3(3), 421-428.
- Hasset, C., Lin, J., Carty, L., Laurenzana, E. & Omiecinski, C. (1997). Human hepatic microsomal epoxide hydrolase comparative analysis of polymorphic expression. *Arch. Biochem. Biophys.*, 337(2), 275-283.
- Hasset, C., Robinson, K., Beck, N & Omiecinski, C. (1994b). The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1) complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics*, 23,433-442.
- Haustein, KO. (2000). Health consequences of passive smoking. *Wien. Med. Wochenschr.*, 150 (11), 233-244.
- Hayes, J. & Strange, R. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61, 154-166.
- Hayes, JD. & Pulford, DJ. (1995). The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 30(6), 445-600.
- Heckbert, S., Weiss, N., Hornung, S., Eaton, D. & Motulsky, A. (1992). Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking-related cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, 84(6), 414-422.
- Heeschen, C., Jang, J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R., Tsao, P., Johnson, F. & Cooke, J. (2001). Nicotine stimulates angiogenesis and promote tumor growth and atherosclerosis. *Nature*, 7(7), 833-839.
- Henningfield, J. & Benowitz, N. (1995). Cigarettes and addiction. *Br. Med. J.*, 310(6987), 1082-1083.
- Hirvonen, A., Hussafvel-Pursiainen, K., Antilla, S. & Vanio, H. (1993). The GSTM1 genotype as a potential risk modifier for squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis*, 14 (7), 1479-1481.

- Hong, YJ., Lee, JK., Lee, GH. & Hong, SI. (2000). Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on larynx cancer risk among Korean smokers. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38 (9), 917-919.
- Houlston, R. (1999). Glutathione S-Transferase M1 status and lung cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 8, 675-682.
- *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic risk of Chemicals to Humans. Vol 38. Tobacco smoking.* IARC. Lyon. 1986.
- Inskip, A., Elexpuru-Camiruaga, J., Buxton, N., Dias, P., Macintosh, J., Campbell, D., Jones, P., Yengi, L., Talbot, A., Strange, R. & Fryer, A. (1995). Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1\*A. *Biochem. J.*, 312, 713-716.
- Janhke, V., Matthias, C., Fryer, A. & Strange, R. (1996). Glutathione S-transferase and cytochrome- P450 polymorphisms as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. *Am. J. Surg.*, 172(6), 671-673.
- Johnson, N. (2001). Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J. Dent. Educ.*, 65(4), 328-339.
- Jourenkova-Mironova, N., Voho, A., Bouchardy, C., Wikman, H., Dayer, P., Benhamou, S. & Hirvonen, A. (1999). Glutathione S-transferase GSTM3 and GSTP1 genotypes and larynx cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 8(2), 185-188.
- Jourenkova-Mironova, N., Wikman, H., Bouchardy, C., Voho, A., Dayer, P., Benhamou, S. & Hirvonen A.(1998a). Role of glutathione S-transferases GSTM1 GSTM3, GSTP1 and GSTT1 genotypes in modulating susceptibility to smoking-related lung cancer. *Pharmacogenetics*, 8(6), 495-502.
- Jourenkova-Mironova, N., Reinikainen, M., Bouchardy, C., Dayer, P., Benhamou, S. & Hirvonen, A. (1998b). Larynx cancer risk in relation to glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and tobacco smoking. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 7(1),19-23.

- Jourenkova-Mironova, N., Mitrunen, K., Bouchardy, C., Dayer, P., Benhamou, S. & Hirvonen, A. (2000) High-Activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Res.* 60, 534-536.
- Kato, T., Nagata, N., Kuroda, Y., Itoh, H., Kawahara, A., Kuroki, N., Ookuma, R. & Bell, D. (1996). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) genetic polymorphism and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 17 (9), 1855-1859.
- Keicho, N., Emi, M., Kajita, M., Matsushita, I., Nakata, K., Azuma, A., Ohishi, N. & Kudoh, S. (2001). Overestimated frequency of a possible emphysema-susceptibility allele when microsomal epoxide hydrolase is genotyped by the conventional polymerase chain reaction-based method. *J. Hum. Genet.*, 46(2), 96-98.
- Kelsey, KT., Spitz, MR., Zuo, ZF. & Wienke, JK. (1997). Polymorphisms in the glutathione S-transferase class  $\mu$  and  $\theta$  genes interact and increase susceptibility to lung cancer in minority populations (Texas, United States). *Cancer Causes Control*, 8, 544-553.
- King, R. *Cancer Biology*. Logman. Singapore. 1996.
- Kwok, S & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339, 237-238.
- Lafuente, A., Maristany, M., Arias, C., Cuchi, A., Lafuente, MJ., Molina, R., Ballesta, A. & Trasserra, J. (1998). Glutathione and glutathione s-transferases in human squamous cell carcinomas of the larynx and GSTM1 dependent risk. *Anticancer Res.*, 18(1), 107-111.
- Lai, C. & Shields, PG. (1999). The role of interindividual variation in human carcinogenesis. *J. Nutr.*, 129(2S Suppl), 552S-555S.
- Landi, S. (2000). Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat. Res.*, 463, 247-283.
- Lang, M. & Pelkonen, O. (1999). Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. En: Vineis, P., Malalts, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J. & Boffeta, P. editors. *Metabolic polymorphisms and Susceptibility to*



- Cancer*. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 13-22.
- Laughlin, LT., Tzeng, HF., Lin, S. & Armstrong, RN. (1998). Mechanism of microsomal epoxide hydrolase. Semifunctional site-specific mutants affecting the alkylation half reaction. *Biochemistry*, 37(9), 2897-2904.
  - Laurenzana, E., Hasset, C. & Omiecinski, C. (1998). Post-transcriptional regulation of human microsomal epoxide hydrolase. *Pharmacogenetics*, 8, 157-167.
  - Leonard, CT. & Sachs, DP. (1999). Environmental tobacco smoke and lung cancer incidence. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 5 (4), 189-193.
  - Lewin, B. *Genes VI*. Oxford University Press. Oxford. 1997.
  - Lewis, D. *Cytochromes P450. Structure, Function and Mechanism*. Taylor & Francis. Londres. 1996.
  - Li, A. & Heflich, R. *Genetic Toxicology*. CRC press. 1991.
  - Lin, P., Wang, SL., Wang, HJ., Chen, KW., Lee, HS., Tsai, KJ., Chen, CY., & Lee, H. (2000). Association of CYP1A1 and microsomal epoxide hydrolase polymorphisms with lung squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*. 82 (4), 852-857.
  - London, S., Smart, J., & Daly, A. (2000). Lung cancer risk in relation to genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase among African-American and Caucasian in Los Angeles County. *Lung Cancer.*, 28, 147-155.
  - London, SJ., Daly, AK., cooper, J., Navidi, WC., Carpenter, CL. & Idle, JR. (1995). Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk among African American and Caucasians in Los Angenles County, California. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 87(16), 1246-1253.
  - Macdonald, F. & Ford, C. *Molecular Biology of Cancer*. The medical perspectives series. Bios Scientific Publishers. Oxford. 1997.
  - Maghgoub, A., Idle, J.R., Dring, L.G., Lancaster, R. & Smith, R.L. (1977). Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*, 2, 584-586.
  - Maniatis, T., Fritsch, E. & Sambrook, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York. 1987.



- Marruecos, L., Nogué, S. & Nolla, S. *Toxicologia clínica*. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona. 1993.
- McGlynn, K., Rosvold, E., Lustbader, E., Hu, Y., Clapper, M., Zhou, T., Wild, C., Xia, XL., Baffoe-Bonnie, A., Ofori-Adjei, D., Chen, GC., London T., & Buetow, K. (1995). Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 2384-2387.
- McWilliams, JE., Sanderson, BJ., Harris, EL., Richert-Boe, KE. & Henner, WD. (1995a). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 4(6), 589-594.
- McWilliams, JE., Sanderson, BJS., Harris, EL., Richert-Boe, KE. & Henner, WD. (1995b). Glutathione S-Transferase M1 deficiency is associated with a moderate increase in risk of developing lung cancer. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 36, 121.
- Meyer, U. & Zanger, U. (1997). Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 37, 269-296.
- Miller, M., McCarver, D., Bell, D., Eaton, D., & Goldstein J. (1997). Genetic polymorphisms in human drug metabolic enzymes. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 40, 1-14.
- Nebert, D. & Weber, W. (1990). Pharmacogenetics. En: Pratt, W, & Taylor, P. editors. *Principles of drug action (the basis of pharmacology)*. 3a edició. Churchill Livingstone. New York. 469-532.
- Nebert, D. (1997). Polymorphisms in drug metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am. J. Hum. Genet.*, 60(2), 265-271.
- Nelson, HH., Wienke, JK., Christiani, DC., Cheng, TJ., Zuo, ZF., Schwartz, BS., Lee, BK., Spitz, MR., Wang, M. & Xu, X. (1995). Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, 16, 1243-1245.
- Oesch, F., Schladt, L., Knehr, M., Dohmer, J. & Thomas, H. *Epoxide hydrolase isoenzymes and their individual contribution to the control of toxic metabolites*. NATO ASI series. Series A. Life science. 202. Plenum press. New York. 1991.

- Oke, B., Akbas, F., Aydin, M. & Berkkan, H. (1998). GSTT1 null genotype frequency in a Turkish population. *Arch. Toxicol.*, 72 (7), 454-455.
- Omiecinski, C., Hasset, C. & Hosagrahara, V. (2000). Epoxide hydrolase-polymorphisms and role in toxicology. *Toxicol. Lett.*, 112-113, 365-370.
- Omiecinski, C., Aicher, L. & Swenson, L. (1994) Developmental expression of human microsomal epoxide hydrolase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 269(1), 417-423.
- Ong, EK. & Glantz, SA. (2000). Tobacco industry efforts subverting International Agency for Research on Cancer's second-hand smoke study. *Lancet*, 355(9211), 1253-1259.
- Pardell, H. (1999). L'epidèmia de tabaquisme a Catalunya i Balears. *Annals de Medicina*, 82,108-109.
- Pardell, H., Saltó, E., Tresseras, R., Juncà, S., Fernández, E., Vicente, R., Segura, A., Rius, E. & Salleras, LL. (1996). La evolución del hábito tabáquico en Catalunya, 1982-1994. *Med. Clin.*, 109, 125-129.
- Pavanello, S. & Clonfero, E. (2000). Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutat. Res.*, 463, 285-308.
- Pelkonen, O., Raunio, H., Rautio, A. & Lang, M. (1999). Xenobiotic-metabolizing enzymes and cancer risk: correspondence between genotype and phenotype. En: Vineis, P., Malalts, N., Lang, M., d'Errico, A., Caporaso, N., Cuzick, J. & Boffeta, P. editors. *Metabolic polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon.77-88.
- Pemble, S., Wardle, A. & Taylor, J. (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochem.J.*, 319, 749-754.
- Persson, I., Johansson, I., Lou, YC., Yue, QY., Duan, LS., Bertilsson, L., & Ingelman-Sundberg, I. (1999). Genetic polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes among chinese lung cancer patients. *Int. J. Cancer*, 81, 325-329.

- Phillips, D. & Sims, P. (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites: their reactions with nucleic acids. En: Grover, P. CRC Chemical Carcinogens and ADN. Vol II. CRC Press. Boca-Raton.
- Pianezza, M., Sellers, E. & Tyndale, R. (1998). Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature*, 393, 150.
- Pitard, A., Brennan, P., Clavel, J., Greiser, E., Lopez-Abente, G., Chang-Claude, J., Wahrendorf, A., Serra, C., Kogevinas, M. & Boffeta, P. (2001). Cigar, pipe, and cigarette smoking and bladder cancer risk in European men. *Cancer Causes Control*, 12(6), 551-556.
- Raaka, S., Hasset, C. & Omiecinski, C. (1998). Human microsomal epoxide hydrolase: 5'-flanking region genetic polymorphisms. *Carcinogenesis*, 19(3), 387-393.
- Ruddon, R. (1990). Chemical carcinogenesis. En: Pratt, W. & Taylor, P. editors. *Principles of drug action (the basis of pharmacology)*. 3a edició. Churchill Livingstone. New York. 735-774.
- Ryberg, D., Skaug, V., Høwer, A., Phillips, D., Harries, L., Wolf, C., Oğreid, D., Ulvik, A., Vu, P. & Haugen, A. (1997). Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, 18 (7), 1285-1289.
- Saarikoski, S., Vohó, A., Reinikainen, M., Anttila, S., Karjalainen, A., Malaveille, C., Vainio, H., Husgafvel-Prusiainen K. & Hirvonen, A. (1998). Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. *Int. J. Cancer*, 77, 516-521.
- Saito, S., Lida, A., Sekine, A., Eguchi, C., Miura, Y. & Nakamura, Y. (2001). Seventy genetic variations in human microsomal and soluble epoxide hydrolase genes (EPHX1 and EPHX2) in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* 46(6), 325-329.
- Salleras, L., Pardell, H., Saltó, E., Martín, G., Serra, L., Plans, P., Tresserras, R. & Taberner, J.L. (1994). Consejo antitabaco. *Med. Clin.*, 102, 109-117.

- Sancho, E., Ramirez, J. & Guillot, M. (2000). Principio de inmortalidad del cancer y telomerasa. En :Rosell, R. Manual de oncología clínica y molecular. Aran. Madrid.135-144.
- Sancho-Garnier, H. & Theobald, S. (1993). Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risc II: pharynx and larynx cancer. *Eur. J. Cancer*, 29A(2), 273-276.
- Seidegard, J. & DePierre, J. (1983). Microsomal epoxide hydrolase properties, regulation and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 695, 51-270.
- Seidegard, J., Pero, R., Miller, D. & Beattie, E. (1986). Glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis*. 7, 751-753.
- Sellers,T. (1996). Familiar predisposition to lung cancer. En: Eeles, R., Ponde, D., Easton, F. & Horwich, A. editors .*Genetic predisposition to cancer*. Capman & Hall. Londres. 344-353.
- Sentís, J., Pardell, H., Cobo, E. & Canela, J. Manual de bioestadística. 2a edició. Masson. Barcelona. 1995.
- Servicio de Epidemiología del Cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y consumo. <http://193.146.50.130/>.
- Sigma Diagnostics ®. Leucocyte Separation. Procedure No.1119. 1994.
- Sigma®. PCR optimization Kit. Technical Bulletin no. MB-240. 1997.
- Silva, LC. *Excursión a la regresión logística en ciencias de la salud*. Diaz de Santos. Madrid. 1995.
- Skoda, RC., Demierre, A., McBride, OW., Gonzalez,.J., & Meyer, UA. (1988). Human microsomal xenobiotic epoxide hydrolase. Complementary DNA sequence, complementary DNA-directed expression in COS-1 cells, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.*, 263(3), 1549-1554.
- Smith, C. & Harrison, D. (1997). Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet*, 350, 630-633.



- Sommer, S., Groszback, A. & Bottema, C. (1992). PCR amplification of specific alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *BioTechniques*, 12(1),82-87.
- Spurdle, AB., Purdie, DM., Webb, PM., Chen, XQ., Green, A. & Chenevix, G. (2001). The microsomal epoxide hydrolase Tyr133His polymorphism: association with risk of ovarian cancer. *Mol. Carcinog.*, 30(1), 71-78.
- Sreelekha, TT., Ramadas, K., Pandey, M., Thomas, G., Nalinakumari, KR. & Pillai, MR. (2001). Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in indian oral cancer. *Oral Oncol.*, 37(7), 593-598.
- Strange, R & Fryer, A. (1999). The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. En: Vineis, P., Malalts, N., Lang, M., d'Errico,A., Caporaso, N., Cuzick, J. &Boffeta, P. editors. *Metabolic polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No.148. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 231-249.
- Strange, R., Jones, P. & Fryer, A. (2000). Glutathione S-Transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol. lett.*, 112-113, 357-363.
- Taioli, E. (1999). International collaborative study on genetic susceptibility to environmental carcinogens. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 8, 727-728.
- Thompson, M &Thompson, J. *Genética en Medicina*. 4a edició. Masson. Barcelona. 1996.
- Tiemersma, E.W., Omer, R.E., Bunschoten, A., Van't-Veer, P., Kok, F.J., Idris, M., Kadaru, A., Fedail, S. & Kampman, E. (2001). Role of genetic polymorphism of glutathione S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10(7), 785-791.
- To-Figueras, J. (1999). Tabaco y cáncer: de la asociación epidemiológica a la evidencia molecular. *Med. Clin.* 112, 589-594.
- To-Figueras, J. Gene, M., Gomez-Catalan, J., Pique, E., Borrego, N., Marfany, G., Gonzalez-Duarte, R. & Corbella, J. (2000). Polymorphism of glutathione S-transferase



- M3: interaction with glutathione S-transferase M1 and lung cancer susceptibility. *Biomarkers*, 5(1), 73-80.
- To-Figueras, J., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Fuentes, M., Rodamilans, M., Huguet, E., Estape, J. & Corbella, J. (1996). Glutathione S-transferase M1 and codon 72 p53 polymorphisms in a northwestern mediterranean population and their relation to lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 5, 337-342.
  - To-Figueras, J., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Galan, MC., Fuentes, M., Ramon, J., Rodamilans, M., Huguet, & Corbella, J. (1997). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis*, 18(8), 1529-1533.
  - Tzeng, HF., Laughlin, LT. & Armstrong, RN. (1998). Semifunctional site-specific mutants affecting the hydrolytic half reaction. *Biochemistry*, 37(9), 2905-2911.
  - Ulrich, CM., Bigler, J., Whitton, JA., Bostick, R., Fosdick, L. & Potter, JD. (2001). Epoxide hydrolase Tyr 113 polymorphism is associated with elevated risk of colorectal polyps in the presence of smoking and high meat intake. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10(8), 875-882.
  - Vaqué, J., Almaraz, A. & Roselló, J. (2001). Tabaco y salud. En: Piédrola, G. *Medicina Preventiva y Salud Pública*. 10a Edició. Masson. Barcelona. 945-958.
  - Vineis, P., Malalts, N., Porta, M. & Real, F. (1999). Human cancer, carcinogenic exposures and mutation spectra. *Mutat. Res.*, 436, 185-194.
  - Violet D. (1993). Glutathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Critical Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 28(3), 173-207.
  - Vollhardt, K. *Química orgànica*. Omega. Barcelona. 1992.
  - Watson, M., Stewart, R., Smith, G., Massey, T. & Bell, D. (1998). Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, 19 (2), 275-280.
  - Wei, D., Gu, J., Cheng, L. Bondy, M., Jiang, H., Ki, W. & Spitz, M. (1996). Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer. *Cancer Res.*, 56, 3975-3979.

- Weintraub, S. (1998). Lung Cancer. The role of Tumor Suppressor Genes. En: Jameson, J.L. *Principles of Molecular Medicine*. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 357-361.
- Whalen, R. & Boyer, T. (1998). Human glutathione S- transferases. *Semin. Liver Dis.*, 18 (4), 345-356.
- Wilson, NM. & Omiecinski, C. (1989). Xenobiotic microsomal epoxide hydrolase: 5' sequence of the human gene. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1008(3), 357-358.
- Wormhoudt, L., Commandeur, J. & Vermeulen, N. (1999). Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione s-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, 29(1), 59-124.
- Wu, X., Gwyn, K., Amos, C., Makan, N., Hong, WK., & Spitz, M. (2001). The association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in African-American and Mexican-American. *Carcinogenesis*, 22(6), 923-928.
- Yoshikawa, M., Hiyama, K., Ishioka, S., Maeda, H., Maeda, A. & Yamakido, M. (2000). Microsomal epoxide hydrolase genotypes and chronic obstructive pulmonary disease in Japanese. *Int. J. Mol. Med.*, 5, 49-53.
- Zhou, W., Thurston, SW., Liu, G., Xu, LL., Miller, DP., Wain, JC., Lynch, TJ., Su, L. & Christiani, DC. (2001). The interaction between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 10(5), 461-466.