



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
SAN ANTONIO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Ciencias de la Salud

EMUPOLIN: Estudio Múltiple de Polimorfismos  
Genéticos en pacientes de Linfomas de Células B  
Maduras

Autor:

Fº JAVIER RUIZ COSANO

Directores:

Dr. D. PABLO CONESA ZAMORA

Dr. Dña. MARÍA DEL MAR MARTÍNEZ SENAC

Murcia, 20 de JUNIO de 2014





# UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Pablo Conesa Zamora y el Dr. Dña. María del Mar Martínez Senac como Directores <sup>(1)</sup> de la Tesis Doctoral titulada "Estudio Múltiple de Polimorfismos Genéticos en pacientes de Linfomas de Células B" realizada por D. Fº Javier Ruiz Cosano en el Departamento de Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

**LO QUE FIRMO, PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS REALES DECRETOS 99/2011, 1393/2007, 56/2005 Y 778/98, EN MURCIA A 20 DE JUNIO DE 2014.**

<sup>(1)</sup> Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.



## AGRADECIMIENTOS:

La elaboración de esta tesis ha sido posible gracias al apoyo de mis directores de Tesis Pablo y Merry, los cuales han sido mis guías en este largo proceso. Han estado conmigo en todo momento haciendo gala de una enorme paciencia y mano izquierda, por todo esto les agradezco mucho su ayuda sin la cual este trabajo no hubiera sido posible.

Tampoco he de olvidar la colaboración de otros profesionales sanitarios de los centros H.U. Santa María del Rosell, H.U. Morales Meseguer, Centro de Hemodonación de Murcia, y gente que me ha enseñado y ayudado.

Por supuesto que también he de agradecer en gran manera a la gente que ha estado más cerca de mí en los momentos más difícil, dándome las fuerzas necesarias para seguir adelante, ella sabe quién es y lo mucho que me hace falta y ayuda, gracias Beatriz.



1. INTRODUCCIÓN	20
1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL LINFOMA	25
1.1.1 Epidemiología de Linfomas en España.....	27
1.2 PATOGÉNESIS DEL CÁNCER:	29
1.2.1 Factores genéticos .....	31
• Cánceres hereditarios-Mutaciones en línea germinal:.....	31
• Cánceres esporádicos-Mutaciones Somáticas: .....	32
• Genes implicados en el cáncer:.....	32
1.3 POLIMORFISMOS: DEFINICIÓN Y CONCEPTOS	34
1.3.1 Polimorfismos en el número de repetición en tándem: .....	34
1.3.2 Polimorfismo de nucleótido simple (SNPs): .....	35
1.4 FACTORES MEDIOAMBIENTALES EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER	39
1.4.1 Sustancias químicas con poder carcinogénico.....	40
1.4.2 Mecanismos de daño en el ADN .....	42
• Especies reactivas del oxígeno (ROS): .....	42
• Formación de aductos con el ADN:.....	43
1.5 EXPOSICION A TOXICOS	46
1.5.1 Agentes biológicos.- Infecciones: .....	46
1.5.2 Radiaciones:.....	48
1.5.3 Sustancias Químicas: .....	49
1.6 CARCINÓGENOS OCUPACIONALES	52
1.6.1 Arsénico y derivados: .....	53
1.6.2 Asbestos.....	54
1.6.3 Oxido de Etileno.....	55
1.6.4 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs) .....	56
1.6.5 Aminas aromáticas.....	59
1.7 DEFENSA FRENTE A TOXICOS.-METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS	61
1.7.1 Reacciones de Biotransformación: .....	62
• Reacciones de Fase I:.....	63



• Reacciones de fase II:	65
1.7.2 Factores que modifican la Biotransformación:	68
• Factores fisiopatológicos:	68
• Factores genéticos.-Polimorfismos genéticos:	69
1.8 ENZIMAS DE METABOLIZACIÓN DE TÓXICOS	70
1.8.1 Glutación transferasas (GST):	70
1.8.2 Quinona Oxidoreductasa 1 (NQO1):	73
1.8.3 Paraoxonasa 1 (PON1):	76
1.8.4 Epóxido hidrolasa microsomal 1 (EPHX1 ó mEH1):	79
1.9 MECANISMOS DE REPARACIÓN Y SÍNTESIS DEL ADN	80
1.9.1 Reparación directa:	81
1.9.2 Reparación por escisión de base (BER):	82
1.9.3 Reparación por escisión de nucleótido (NER):	84
• Xeroderma Pigmentosum grupo A (XPA):	87
• Excision repair cross-complementing 5 (ERCC5)	88
1.9.4 Reparación de desapareamiento de bases (MMR):	89
1.9.5 Reparación sobre la marcha:	91
• Metionina sintetasa (MS)	91
1.10 POLIMORFISMOS EN GENES DE METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.- RIESGO DE CÁNCER	94
1.10.1 Polimorfismos de las Enzimas Glutación Transferasas (GST):	95
1.10.2 Polimorfismos de la Enzima Quinona Oxidoreductasa 1 (NQO1):	98
1.10.3 Polimorfismos de la Enzima Paraoxonasa sérica/arilesterasa 1 (PON1):	99
1.10.4 Polimorfismos de Enzima Epóxido Hidroxilasa Microsomal 1 (EPHX1):	101
1.11 POLIMORFISMOS EN GENES DE REPARACION Y SÍNTESIS DEL ADN.- RIESGO DE CANCER	104
1.11.1 Polimorfismo enzima <i>Xeroderma Pigmentosum</i> grupo A (XPA):	104
1.11.2 Polimorfismo enzima Excision Repair Cross-Complementing (ERCC5):	106
1.11.3 Polimorfismos de la enzima Metionina Sintasa o Sintetasa (MS):	107
2. OBJETIVOS	111
3. MATERIALES Y METODOS	115



3.1 Procedencia de las muestras:	115
3.2 Zona geográfica elegida de estudio:.....	118
3.3 Definición de Exposiciones: .....	119
3.4 Selección y caracterización de los polimorfismos más significativos: .....	121
3.5 Preparación de las muestras:.....	122
3.6 Genotipado de las muestras:.....	124
3.6.1 Genotipado con PCR Multiplex del polimorfismo GSTT1 y GSTM1: .....	124
3.6.2 Genotipado de las muestras mediante sondas Taqman.....	126
3.6.3 Genotipado <i>EPHX1</i> rs1051740 mediante técnica Amplifluor.....	130
3.7 Análisis Estadístico en el estudio:.....	132
4. RESULTADOS	137
4.1 Resultados del SNP GSTT1 y GSTM1: .....	137
• Análisis del SNP según grupos poblacionales y tipos de exposición:.....	140
• Evaluación del SNP con los diferentes tipos de linfoma:.....	141
4.2 Resultados de los SNP de enzimas de metabolización. ....	142
• Análisis de la población total: .....	143
• Resultados según el tipo de exposición:.....	145
• Análisis de la población según modelo codominante: .....	146
• Análisis por tipo de enfermedad.....	147
• Estudio de desequilibrio de alelos: .....	147
4.3 Resultados de los SNP de enzimas de reparación y síntesis de ADN ( <i>ERCC5</i> , <i>XPA</i> y <i>MTR</i> .).....	148
• Análisis de los polimorfismos en la población y por género: .....	149
• Análisis de la población sesgando por tipo de enfermedad: .....	150
5. DISCUSIÓN	155
5.1 Polimorfismo de Metabolización GSTs:.....	155
5.2 Polimorfismos de enzimas de metabolización: <i>EPHX1</i> , <i>NQO1</i> y <i>PON1</i> .....	157
5.3 Polimorfismos de enzimas de metabolización: <i>XPA</i> , <i>ERCC5</i> y <i>MS</i> . ....	160
6. CONCLUSIONES	164



## **ABREVIATURAS**

A: Adenina	NTG: Nitrosoguanidina
ADN: Acido Desoxirribonucleico	NQO1: Quinona Oxidoreductasa 1
APC: Poliposis Adenomatosa coli	PON1: Paraoxonasa 1
ARN: Acido Ribonucleico	NER: Reparación por escisión de nucleótidos.
ARNm: ARN mensajero	MMR: Reparación de Desapareamiento de Bases
BaP: Benzo (a) Pireno	OMS: Organización Mundial de la Salud
BER: Reparación por Escisión de Bases	PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
C: Citosina	PAPS:3´-fosfoadenosil-5´-fosfosulfato TP53: Proteína Tumoral 53
CoA: Coenzima A	rSNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple en regiones Reguladoras
CoQ: Coenzima Q	ROS: Especies Reactivas del Oxígeno.
cSNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple en regiones Codificantes	RB1: Retinoblastoma 1
CYP450: Citocromo P-450	SNPs: Polimorfismos de Nucleótido SAM: S-adenosilmetionina
dGC8: Desoxiguanosina 9-Fenil	SNC: Sistema Nervioso Central Simple
dTMP: Desoxitimidil monofosfato	TCR: Transcripción de Acoplamiento de Reparación
dUMP: Desoxiuridin-monofosfato	T: Timina
EPHX o mEH1: Epóxido Hidrolasa microsomal	UGTs: Glucuronosil Transferasas
G: Guanina	U: Uracilo
gSNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple en regiones Intergenómicas.	VEB: Virus Epstein-Barr
GSTP1: Glutación Transferasa isoforma "Pi"	VIH: virus de inmunodeficiencia humana
Hcy: Homocisteína	VNTR: Polimorfismos en el número de repetición en tándem
HcyT: Homocisteína tiolactonasa	VHC: Virus Hepatitis C
GGR: Reparación Genómica Global	VHL: gen de Von Hippel Lindau
GSH: Glutación	VPH: Virus Papiloma Humano
GST: Glutación Transferasas	MTR: Metionina Sintetasa
HHV-8: Virus Herpes Humano tipo 8.	THF: Tetra-Hidrofolato
HTLV-I: Virus Linfotrópicos de células T	Met: Metionina
IARC: La Agencia Internacional de Lucha contra el Cáncer	XB: Xenobiótico
IgH: Inmunoglobulina H	ERRC5: Excision Repair Cross-Complementing
iSNP: Polimorfismo de Nucleótido Simple en regiones Intrónicas	XP: Xeroderma Pigmentosum
LH: Linfoma de Hodgkin	XPG: Xeroderma Pigmentosum grup G
LDL: Lipoproteína de baja densidad	
LNH: Linfoma No Hodgkin	
MALT: Tejido Linfoide asociado a mucosas.	
NCBI: National Center of Biotechnology Information	



## Índice de Figuras:

**Fig. 1.** Datos de incidencia del cáncer a nivel mundial.

Fig. 2. Mecanismo de la carcinogénesis.

**Fig. 3.** Figura representativa de los polimorfismos de repetición en tándem.

**Fig. 4.** Clasificación de los diferentes tipos de SNP, de acuerdo con su localización en el genoma.

**Fig. 5.** Consecuencias de los polimorfismos en función de su localización en el gen.

**Fig.6.** Esquema de actuación-metabolismo de los carcinógenos en el organismo.

**Fig. 7.** Estructura del ADN vista mediante Rayos-X, inserción del Pyriplatin como aducto en la doble hélice.

**Fig. 8.** Estructura básica del oxido de etileno.

**Fig. 9.** Activación metabólica del 1-nitropireno y la formación de aductos de ADN y hemoglobina

**Fig. 10.** Estructura general de las aminas aromáticas.

**Fig.11.** Esquema de las posibles biotransformaciones de un xenobiótico una vez ingresado en el organismo

**Fig. 12.** Esquema de las reacciones de metabolización de xenobióticos en el ser humano.

**Fig. 13.** Papel del glutatión en la detoxificación de xenobióticos y especies ROS como responsable del mantenimiento de equilibrio redox.

**Fig. 14.** Repercusión de los diferentes polimorfismos genéticos que condicionan el funcionamiento anormal de las enzimas

**Fig. 15.** Reacción general en la que las GST participan, añadiendo un grupo Glutatión al Xenobiótico a eliminar.

**Fig. 16.** Mecanismo de NQO1 de eliminación de ROS mediante reducción de quinonas a hidroquinonas mas soluble.

**Fig. 17.** Mecanismo de acción de NQO1.

**Fig. 18.** Diferentes vías de metabolización de insecticidas organofosforados

**Fig.19.** Mecanismo de acción conjunto de CYP450 y PON1 para la detoxificación de diferentes moléculas insecticidas tóxicos.

**Fig. 20.** Esquema elemental del metabolismo de los organofosforados, papel de las Oxidasas de función mixta (PON1) y su transformación final en alquílfosfatos.

**Fig. 21.** Efectos tóxicos del tabaco en su metabolización por EPHX y Citocromo P-450.

**Fig. 22.** Reacción de reparación de la Guanina metilada

**Fig. 23.** *Mecanismos de reparación por escisión de bases*

**Fig. 24.** Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER).

**Fig. 25.** Mecanismos de reparación NER.

**Fig. 26.** Participación de la enzima XPG (ERRC5) en el corte de la zona dañada en el extremo 3, función endonucleasa.

**Fig. 27.** Mecanismo de reparación MMR.

**Fig. 28.** Reacción general de producción de Metionina a partir de Homocisteína y usando Cobalamina y THF como cofactores.

**Fig. 29.** Hipótesis de daño al AND por metilación aberrante.

**Fig. 30.** Esquema del metabolismo del folato y metionina. Implicación de diferentes enzimas en la síntesis de purinas, entre ellas MTR como enzima esencial en la síntesis de Metionina.



**Fig. 31.** Vía de metabolización de metabolitos del humo del tabaco.

**Fig. 32.** Modelo de asociación entre el daño oxidativo de agentes exógenos y posible daño al ADN con la consecuente predisposición al cáncer.

**Fig. 33.** Vía metabólica del Benzopireno proveniente del humo del tabaco.

**Fig. 34.** Zonas de Atmósfera de especial control.

**Fig. 35.** Resultados de electroforesis capilar de alta resolución.

**Fig. 36.** Mecanismo de acción de Sondas TaqMan.

**Fig. 37.** Representación cartesiana de los resultados de PCR.

**Fig. 38.** Mecanismo de acción de Sondas Amplifluor.

**Fig. 39.** Diagrama Box-Plot del SNP GSTT1 y GSTM1

**Fig. 40.** Porcentajes de tipo de ocupación profesional en la población de casos.

**Fig. 41.** Gráfico de sectores de % de mujeres en las poblaciones de casos y controles

**Fig. 42.** Histograma de barras de la distribución de la población en casos y controles

**Fig. 43.** Distribución de casos y controles según género femenino Fuente.

**Fig. 44.** Diagrama de caja de los grupos de casos y controles para los SNPs de metabolismo y reparación



## Índice de Tablas:

**Tabla 1.** Mortalidad por diferentes tipos de cáncer al año 2008

**Tabla 2.** Mortalidad en tasa cruda anual en el 2008 a nivel mundial y % del total de tumores.

**Tabla 3.** Datos de incidencia y mortalidad por neoplasias hematológicas en España 2008.

**Tabla 4.** Incidencias por tipo de cáncer diagnosticados en 2007

**Tabla 5.** Algunos de los carcinógenos con efecto aducto conocidos y sobre los que más se ha estudiado su posible efecto tanto in vivo como in vitro

**Tabla 6.** Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos PHAs.

**Tabla 7.** Composición de la mezcla de PCR.

**Tabla 8.** Composición mezcla PCR.

**Tabla 9.** Resultados del genotipado de los SNP GSTM1 y GSTT1.

**Tabla 10.** Resultados del genotipado GSTM1 y GSTT1

**Tabla 11.** Resultados del genotipado GSTT1 plus vs. población total.

**Tabla 12.** Resultados del genotipado GSTM1 plus vs. población total.

**Tabla 13.** Resultados SPN GSTM1 y GSTT1 vs. grupos poblacionales.

**Tabla 14.** Resultados del genotipado SNP GSTM1 y GSTT1 vs. LNH

**Tabla 15.** Resultados del genotipado SNP GSTM1 y GSTT1 vs tipos de Linfomas

**Tabla 16.** Resultados de demográficos de EPHX1, NQO1 y PON1

**Tabla 17.** Resultados del genotipado EPHX1, NQO1 y PON1

**Tabla 18.** Resultados de alelos EPHX1, NQO1 y PON1

**Tabla 19.** Resultados de genotipado EPHX1, NQO1 y PON1 vs grupos poblacionales.

**Tabla 20.** Resultados alelos PON1 vs grupos exposición residencial.

**Tabla 21.** Resultados de genotipado EPHX1, NQO1 y PON1 vs población por genero

**Tabla 22.** Resultados de genotipado EPHX1, NQO1 y PON1 vs tipos de linfomas.

**Tabla 23.** Resultados del estudio desequilibrio de ligamiento EPHX1, NQO1 y PON1.

**Tabla 24.** Resultados demográficos de la población a estudio con SNP XPA, ERRC5 y MTR.

**Tabla 25.** RESULTADOS GENOTIPADO SNP XPA, ERRC5 Y MTR VS FRECUENCIAS HAPMAP-CEU.

**Tabla 26.** RESULTADOS GENOTIPADO SNP XPA, ERRC5 Y MTR SEGÚN MODELO CODOMINANTE.

**Tabla 27.** RESULTADOS GENOTIPADO SNP XPA, ERRC5 Y MTR VS TIPOS LINFOMAS.



# INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune consta de una serie de órganos, tejidos y células ampliamente repartidos por todo el cuerpo. El sistema linfático es una parte principal del sistema inmunitario y consta de órganos linfáticos o linfoides (el bazo y el timo), tejidos linfáticos (como la amígdala, las placas de Peyer y la médula ósea), los ganglios linfáticos, los conductos o vasos linfáticos y la linfa. Está considerado como una parte del aparato circulatorio constituyendo la segunda red de transporte de líquidos corporales (Guyton and Hall, 2011).

El sistema linfático cumple cuatro funciones básicas:

- El mantenimiento del equilibrio osmolar en el espacio intercelular.
- Contribuye de manera principal a formar y activar el sistema inmunitario (las defensas del organismo).
- Recolecta el quilo a partir del contenido intestinal, un producto que tiene un elevado contenido en grasas.
- Controla la concentración de proteínas en el intersticio, el volumen del líquido intersticial y su presión.

Los linfomas constituyen un grupo de enfermedades neoplásicas del sistema linfático que tienen como células de origen a los linfocitos B o T que son células del sistema inmunitario. Esta proliferación maligna de linfocitos ocurre generalmente dentro de los nódulos o ganglios linfáticos, aunque a veces afecta también a otros tejidos como el hígado y el bazo. Durante el desarrollo de esta enfermedad se produce una merma en el funcionamiento del sistema inmunitario que puede ser más severa cuanto más se haya diseminado la enfermedad. Además, si la médula ósea se ha visto afectada pueden producirse anemia y/o citopenia de alguna de las células de las series linfoides u otros cambios en las células de la sangre. La etiología de los linfomas no es muy conocida; si bien existen múltiples factores implicados (American Cancer Society, 2013):

**AGENTES INFECCIOSOS**

- Virus de Epstein-Barr
- Virus de hepatitis C
- Herpes virus humanos 6, 7 y 8
- Virus Linfotrópicos de células T (HTLV-I)
- Citomegalovirus
- Virus Simio 40
- *Helicobacter pylori*
- *Campylobacter jejuni*

**INMUNODEFICIENCIAS**

- Inmunodeficiencias congénitas
- Inmunodeficiencias adquiridas; infección por VIH (virus de inmunodeficiencia humana)
- Enfermedades autoinmunes

**OTRAS**

- Agregación familiar
- Susceptibilidad genética

Los linfomas no son de un solo tipo de cáncer, sino un grupo de muchos cánceres relacionados. En realidad, hay cerca de 30 tipos diferentes de linfomas. De modo general, se agrupan en dos categorías: el Linfoma de Hodgkin (LH), que se caracteriza por la presencia de un tipo de célula característica de estirpe B llamada célula de Reed-Sternberg; y el Linfoma no Hodgkin (LNH), que puede afectar a células de linaje B o T.

## 1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL LINFOMA

La Agencia Internacional de lucha contra el Cáncer (IARC) ha elaborado el Proyecto GLOBOCAN 2008, con el objetivo de proporcionar las estimaciones actuales de la incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en 184 países del mundo. Los linfomas no Hodgkin y linfoma Hodgkin ocupan el décimo primero y décimo segundo lugar en mortalidad según el número de casos acumulado, respectivamente. Los datos de incidencia mundial de este tipo de enfermedades estiman que las neoplasia hematológicas componen el 7,5% en hombres y el 6,4% en mujeres del total de cánceres diagnosticados (SEOM, 2013); aumentado las frecuencias cada año según las previsiones (Ferlay J, et al.2010).

Tabla1. Mortalidad por diferentes tipos de cáncer al año 2008

Cáncer	Incidencia		Mortalidad	
	Número	Ratio/ 100.000 Hab	Número	Ratio/ 100.000 Hab
Todos los cánceres excluidos los cánceres de piel no melanoma	196902	241,4	104156	109.5
Mama	22027	61	6008	12.9
Próstata	25231	57,2	6062	10.5
Colorrectal	28551	30,4	14303	13.3
Pulmón	23211	28,8	20327	23.8
Vejiga	13008	14,4	4820	4.3
Cuerpo uterino	4385	10,9	1173	2.0
Estómago	7792	8,4	5978	6.0
Linfoma no-Hodgkin	6380	8,4	2726	2.9
Ovario	3164	8	1864	4.0
Leucemia	4716	7	3282	3.5
Cavidad oral, labio	5167	6,7	1234	1.5
Cérvix uterino	1948	6,3	712	1.9
Hígado	5095	5,8	4631	4.6
Riñón	4529	5,8	1915	2.0
Páncreas	5084	5,5	5043	5.3

Cerebro, sistema nervioso	3521	5,3	2740	3.8
Melanoma cutáneo	3602	5,2	834	1.0
Laringe	3401	4,7	1705	2.1
Tiroides	2258	3,9	285	0.3
Mieloma múltiple	2881	3,1	1899	1.7
Esófago	2118	2,8	1872	2.3
Testículo	698	2,8	40	0.2
Otros cánceres ORL (no laringe)	1773	2,7	889	1.3
Linfoma de Hodgkin	1122	2,4	227	0.3
Vesícula biliar	2001	1,8	1355	1.2
Nasofaringe	445	0,7	206	0.3

Fuente: Informe Globocan de la Organización Mundial de la Salud (IARC, 2008)

Los linfomas componen aproximadamente el 3-4% de los cánceres a nivel mundial. En la siguiente tabla, se observan los datos de mortalidad en el mundo en el año 2008 de las Neoplasias Hemato-oncológicas.

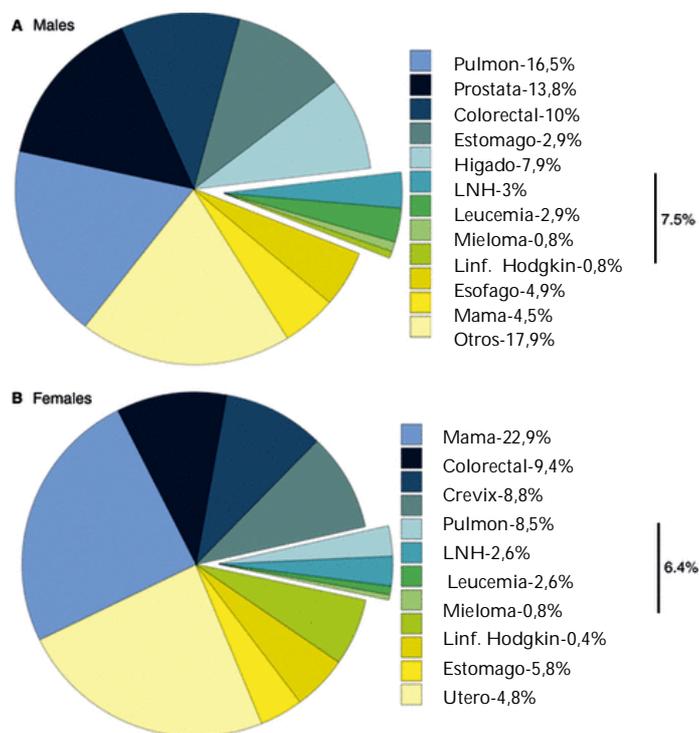
Tabla 2. Mortalidad en tasa cruda anual en el 2008 a nivel mundial y % del total de tumores.

<b>Neoplasias Hematológicas</b>	<b>Nº de defunciones</b>	<b>%</b>
<b>Linfoma Hodgkin</b>	<b>29902</b>	<b>0,4 %</b>
<b>Linfoma no Hodgkin</b>	191599	2.7 %
<b>Mieloma Múltiple</b>	72453	1.0 %
<b>Leucemia</b>	257161	3.6 %

Fuente: Informe Globocan 2008 (IARC, 2008)

Los LNH tiene más incidencia que los LH, de hecho son cuatro veces más frecuentes que los LH (Besses C, et al 1994). Sólo en el año 2008 se diagnosticaron

355.900 nuevos casos a nivel mundial del tipo LNH. La incidencia varía considerablemente entre los diferentes países, pero se sitúa aproximadamente en 3-6 casos por 100.000 habitantes y año. (Weinstein I.B, et al. 1998) (Fig. 1)



**Fig. 1:** Datos de incidencia del cáncer a nivel mundial.

Fuente: Informe Globocan. IARC, 2008.

### 1.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DE LINFOMAS EN ESPAÑA

En las últimas décadas, se ha detectado un aumento constante en la incidencia y mortalidad del grupo de enfermedades hematológicas. Los datos de mortalidad por enfermedades Hematológicas en España en el 2008 se pueden observar en la tabla siguiente. Teniendo en cuenta que España tiene una población de más de 44 millones de habitantes, las defunciones por enfermedades oncohematológicas son más de 8.000, lo que supone aproximadamente un 8,4% de muertes por este tipo de enfermedades, siendo de entre ellas las leucemias las que más defunciones provocaron. En el año 2000,

hubo 1.234 muertes por LNH en varones (puesto número 13 entre todas las causas de muerte por tumor) y 1.101 muertes en mujeres (10º puesto). (AEAL,2013)(**Tabla 3**)

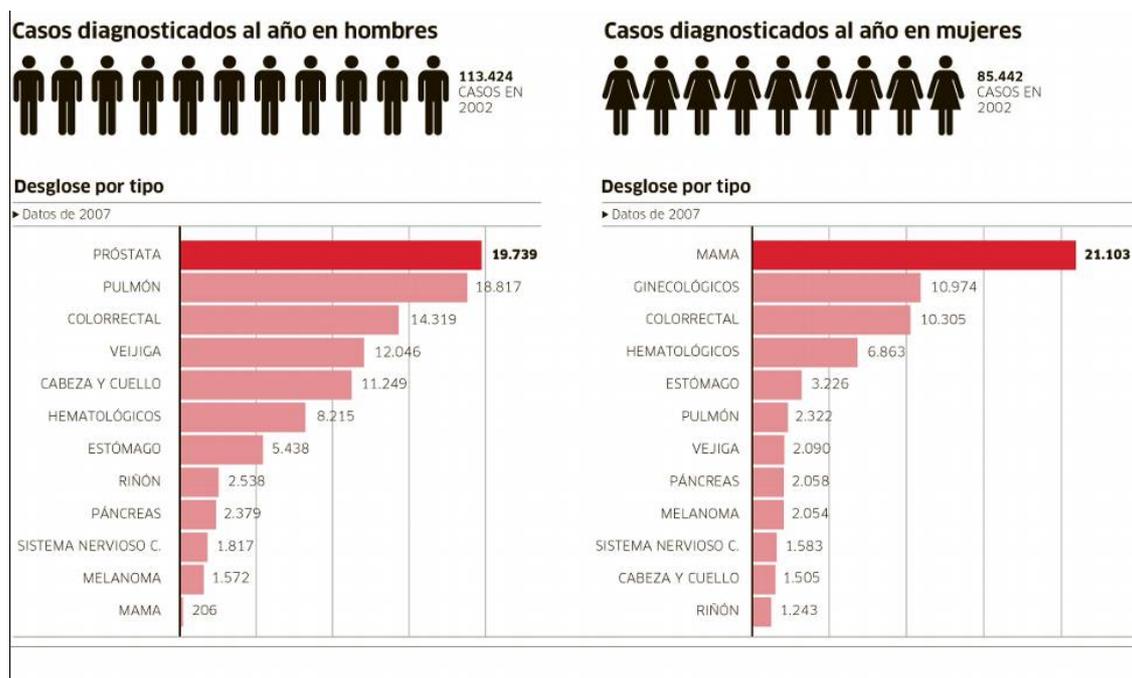
**Tabla 3.** Datos de incidencia y mortalidad por neoplasias hematológicas en España 2008.

	Incidencia		Mortalidad	
	Numero	%	Numero	%
<b>Linfoma Hodgkin</b>	1122	2.4	227	0.3
<b>Linfoma no Hodgkin</b>	6380	8.4	2726	2.9
<b>Mieloma Múltiple</b>	2881	3.1	1899	1.7
<b>Leucemia</b>	4716	7.0	3282	3.5
<b>Total</b>	15.099	20,9%	8134	8,4%

Fuente: (Ferlay J,et al.2010)

Respecto a la incidencia en España (Cabanes Domenech A, et al 2009) de este tipo de enfermedades es importante resaltar que cada año aparecen más de 15.000 nuevos casos por este tipo de tumores, siendo los LNH los más frecuentes. En el periodo de 1997-2000, la incidencia anual de casos de LNH fue de unos 5.400 casos nuevos al año de media, por delante de otras patologías tumorales, como el cáncer de páncreas, hígado, riñón, melanoma u ovario (**Tabla 4**). Hay diferencias poblacionales, pero la estimación actual es que 1 de cada 20 personas desarrollará una neoplasia hematológica a lo largo de su vida.

Tabla 4. Incidencias por tipo de cáncer diagnosticados en 2007

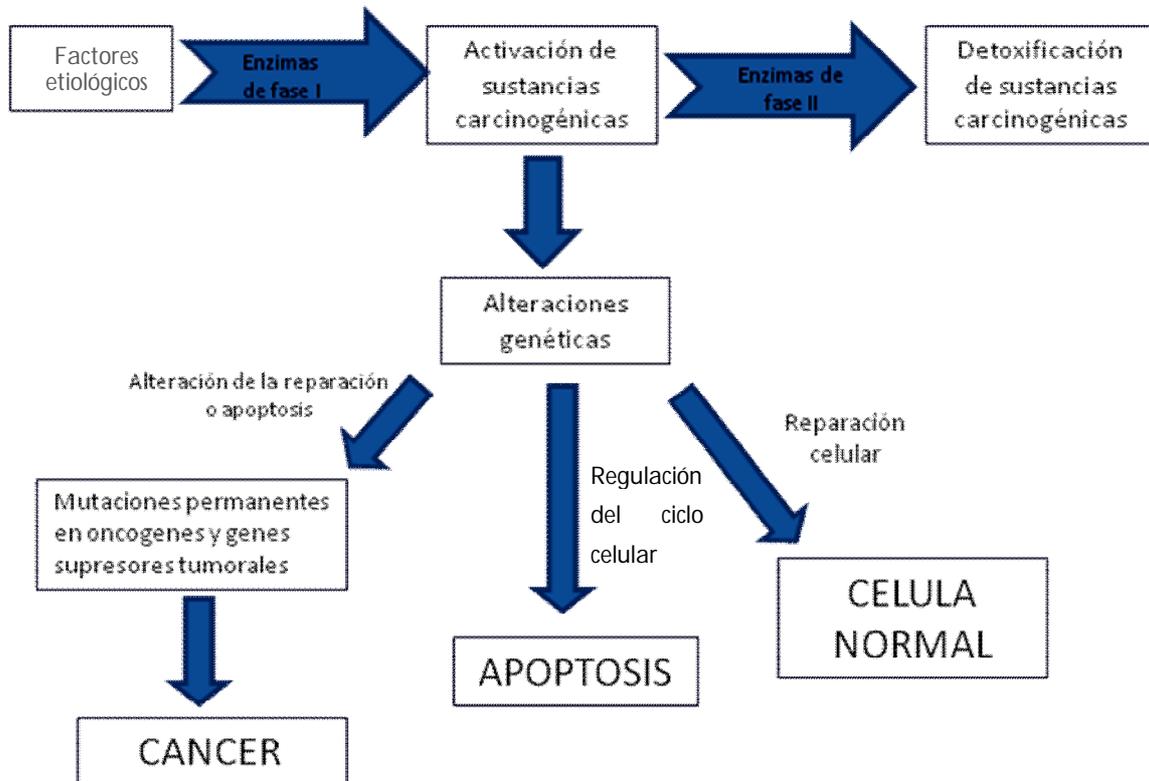


Fuente: (Cabanes Domenech A, et al. 2009)

En España, existe un aumento anual de las tasas de mortalidad de casi el 2% desde 1991 hasta el 2000. De la misma forma, las tasas de incidencia han sufrido un incremento anual, que a nivel de la Unión Europea, ha sido del 4% mientras en España estas cifras han sido aún superiores. España ocupa, entre los países europeos, el quinto lugar en incidencia de LNH en hombres y el sexto en mujeres. La supervivencia global anual es del 89% y del 76% a 5 años(AEAL,2013)

## 1.2 PATOGÉNESIS DEL CÁNCER:

El cáncer es una enfermedad multifactorial, de etiología muy diversa, donde la edad, el sexo, la raza y la herencia pueden ser factores de riesgo. La dieta, los estilos de vida y el medio que nos rodea, incluyendo la infección por microorganismos, también pueden ser factores de riesgo que actúan sobre el genoma de las células iniciando y/o promoviendo la transformación neoplásica. (Fig. 2)



**Fig. 2.** Mecanismo de la carcinogénesis

Fuente: Elaboración propia en base a (Repetto M, 2009)

La mayoría de los cánceres humanos resultan de una acumulación de mutaciones que son adquiridas durante el periodo de vida de una persona como resultado de exposiciones a carcinógenos y a otros mutágenos o como consecuencia de fallos al azar en el desarrollo de funciones normales de la célula. Ocasionalmente, una de estas mutaciones somáticas altera la función de algunos genes importantes, proporcionando una ventaja de crecimiento a la célula portadora de la/s mutación/es.

La afectación de alguno de los mecanismos de reparación celular, de regulación del ciclo celular o de alteración de la apoptosis, contribuye significativamente a la aparición de cáncer. Cada cáncer posee características mutacionales que reflejan su origen; la mayoría deriva de una célula anormal (origen monoclonal) iniciada en un cambio genético por una mutación somática (Ponder BA, et al. 1986). También pueden existir cambios epigenéticos que no afectan directamente el ADN pero sí al patrón de

expresión de un gen.( Díaz Román T, et al. 1998; Weinstein I.B,et al. 1998; Vineis P, 2004)

### 1.2.1 FACTORES GENÉTICOS

Los tumores aparecen en el ser humano como consecuencia de una compleja sucesión de cambios moleculares, entre los que juegan un papel esencial las mutaciones. Las mutaciones pueden proporcionar a la célula que la sufre una mayor independencia del proceso que regula su crecimiento normal, y le permite finalmente dar lugar a un tumor maligno y metastatizante (Wolf CR, et al. 1994). Los genes involucrados con el control del ciclo celular y en la susceptibilidad al cáncer pertenecen a dos categorías principales:

- Por un lado, aquellos que están directamente involucrados en la génesis tumoral; son los oncogenes y los genes supresores. Las mutaciones en estos genes poseen elevada penetrancia y determinan que el tumor aparezca a edad temprana (Knudson AG, 1991).

- Por otro lado, genes que modulan la reacción del organismo frente a los carcinógenos. Estos genes están implicados en los procesos de reparación del ADN y/o en la activación o desactivación metabólica de los múltiples carcinógenos con los que puede interactuar el organismo (Wolf CR, et al. 1994; Rosvold EA, et al. 1995). Las variaciones en estos genes por separado pueden contribuir a la aparición de un determinado escalón mutacional; pero su sola presencia no es suficiente para inducir la aparición de cáncer.

En función del origen celular y momento de la mutación, el cáncer puede ser clasificado como hereditario o esporádico, considerando tal hecho describimos:

- **Cánceres hereditarios-Mutaciones en línea germinal:**

Se conocen más de 50 diferentes tipos de cáncer que demuestran agregación familiar, sugiriendo una predisposición hereditaria, incluyendo tumores de mama, ovario, colon y próstata (Alonso AM, et al. 2006; Harris EL, 1997). Los cánceres hereditarios son causados por mutaciones en línea germinal (en células productoras de

gametos) en determinados genes bien definidos, sobre todo genes supresores de tumores, oncogenes e incluso los genes de reparación del ADN. Estas mutaciones predisponen al individuo a las neoplasias hereditarias (Urioste M, 2013). Los portadores de las mutaciones heredan sus genotipos de predisposición, sin embargo no desarrollan siempre un cáncer, indicando que sus genes alterados poseen una penetrancia incompleta. En estos casos, se requiere una mutación somática en un segundo alelo para que el cáncer se desarrolle.

- **Cánceres esporádicos-Mutaciones Somáticas:**

En el caso de los cánceres esporádicos (o cánceres comunes), la susceptibilidad está determinada por la combinación de múltiples factores genéticos, entre ellos polimorfismos genéticos de tipo simple o de repetición, que afecten a cada individuo.

La mutación somática se origina posteriormente al desarrollo embrionario y solo afectan a la zona que va a desarrollar el tejido tumoral. Una vez que esta célula somática sufre una mutación, todas las células que derivan de ella por divisiones mitóticas heredarán la mutación, esto es la herencia celular. (Hahn WC, et al. 2002; Frank SA, et al. 2004). Estas mutaciones que afectan solamente a las células de la línea somática no se transmiten a la siguiente generación. Los cánceres esporádicos representan aproximadamente el 98% de todos los tipos de cáncer (Kohno T, et al. 2002).

- **Genes implicados en el cáncer:**

Hay que tener en cuenta que tanto si la alteración genética afecta a línea germinal en alelos de alta o baja penetrancia, como si lo hace a la línea somática, en los tumores esporádicos, los genes afectados son esencialmente los mismos. Los genes más frecuentemente implicados en cánceres son:

- 1.- Oncogenes y genes supresores tumorales. Están estrechamente relacionados con el desarrollo de cánceres esporádicos, aunque en menor medida que los de los genes supresores y reparadores. Su mutación también puede conllevar el desarrollo de

cánceres hereditarios, pero de forma infrecuente. Son genes que controlan puntos estratégicos del ciclo celular, la apoptosis y la diferenciación celular. La alteración genética (por mutación puntual, amplificación o reordenamiento cromosómico) produce una ganancia de función en la proteína que codifican de forma que el protooncogén es transformado a oncogén (Hakim J, 1995). Una característica de los linfomas es que la activación de estos oncogenes se produce frecuentemente por translocaciones, o intercambio recíproco de material genético entre dos cromosomas implicando los genes que codifican para la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgH). Por ejemplo, la principal alteración citogenética del linfoma del manto, un tipo de LNH, es la translocación 11;14 que produce sobreexpresión de la ciclina D1, un importante regulador positivo del ciclo celular y la del linfoma folicular es la translocación 14:18 que produce la sobreexpresión de Bcl2, una proteína antiapoptótica.

2.- Genes supresores tumorales. Pueden tener actividades pro-apoptóticas, reparadoras del ADN o inhibidoras del ciclo celular. Son genes recesivos mayoritariamente y se asocian a síndromes hereditarios de predisposición al cáncer. Se dividen en tres tipos: los genes "gatekeepers" que son genes supresores de tumores clásicos como TP53, RB1, VHL o APC, cuya inactivación es determinante para el desarrollo del cáncer específico de tejido; los "caretakers" que no tienen una función esencial para el desarrollo del cáncer pero actúan como supresores indirectos que aceleran el curso del proceso y finalmente, los genes "landscapers" que codifican productos génicos que controlan el microambiente en el que crecen las células, proporcionando a la célula entornos favorables para la proliferación celular no regulada (Kinzler KW, et al. 1997; Bissell MJ, et al. 2001)

3.- Genes de reparación y síntesis de ADN. La mayor parte de los síndromes de cánceres hereditarios en genes que afectan a la reparación o síntesis del ADN suelen ser síndromes recesivos, como Anemia de Fanconi; aunque también los hay dominantes como el cáncer de colon familiar no polipósico (Bartkova J, et al. 1994; Fearon ER, et al. 1987).

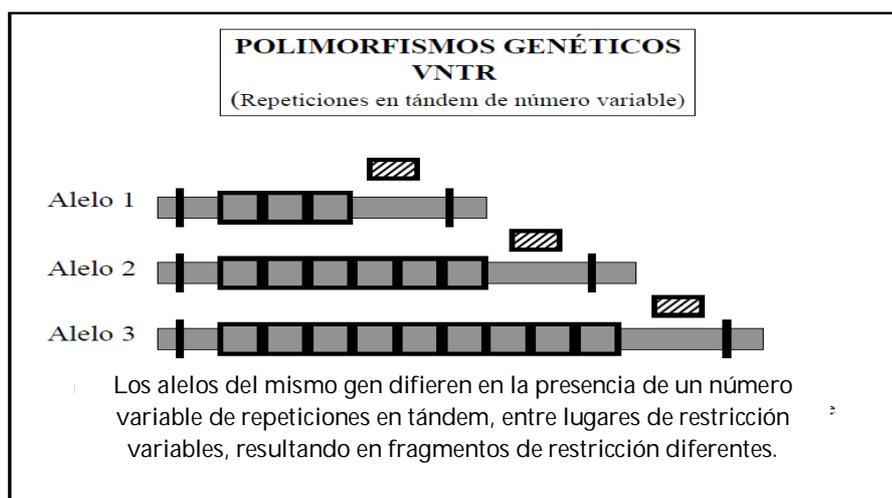
### 1.3 POLIMORFISMOS: DEFINICIÓN Y CONCEPTOS

En esencia, un polimorfismo (SNP) hace referencia a la existencia de múltiples alelos de un gen y es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de los alelos en la población es superior al 1%. Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante de una enzima o a las regiones que regulan su expresión, producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de su expresión; pudiendo afectar directamente al funcionamiento del enzima. A continuación citaremos los diferentes polimorfismos que pueden presentarse:

- Polimorfismos en el número de repetición en tándem (VNTR)
- Polimorfismos de nucleótido simples (SNP)
- Polimorfismo de alelo nulo

#### 1.3.1 POLIMORFISMOS EN EL NÚMERO DE REPETICIÓN EN TÁNDEM:

Del inglés *Variable Number Tandem Repetition* (VNTR). Consisten en variaciones en cuanto al número de veces que aparecen determinadas secuencias repetitivas del ADN. Los microsatélites son locus (lugar concreto del gen en un cromosoma) que corresponden a secuencias de ADN de entre 2 y 5 nucleótidos repetidos en tándem (**Fig. 3**). Los microsatélites presentan dos características que los hacen ideales para su uso como marcadores identificativos de individuos y diagnósticos de patologías: en primer lugar, están distribuidos de forma casi homogénea por todo el genoma y en segundo, presentan un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí, de forma que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto es muy elevada (presentan una alta tasa de heterocigosis) (Weber JL, et al. 1993). Los VNTR-microsatélites han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial aunque últimamente están siendo desplazados por los polimorfismos de nucleótido simple que describimos a continuación (Benson G, 1999)



**Fig. 3.** Figura representativa de los polimorfismos de repetición en tándem.

Fuente: (Benson G, 1999)

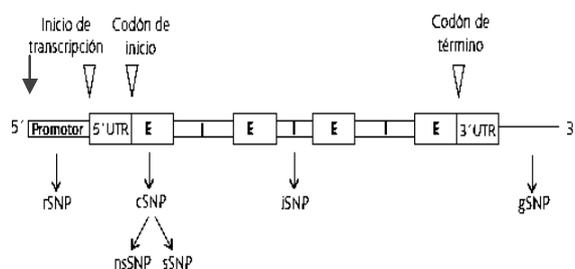
### 1.3.2 POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNPs):

Se conoce la existencia de aproximadamente 10 millones de SNPs, que consisten en una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base (Adenina (A), Timina (T), Citosina (C) o Guanina (G)) de una secuencia del genoma. Sin embargo, algunos autores consideran que pequeñas inserciones y deleciones (*indels*) pueden ser consideradas también como SNP. Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los genotipos presentes en los SNPs (Hattori M, 2005)

En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal "silvestre o salvaje" y el alelo secundario "alelo minoritario o mutante", clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Por tanto, un individuo puede tener uno de estos tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente. Los SNPs pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido denominándose "no sinónimos", estas modificaciones pueden generar un cambio en la estructura cuaternaria de las proteínas (estructura tridimensional) a la que codifican que puede

conllevar cambios en las propiedades funcionales de la proteína (Sunyaev S, et al. 2000; Botstein D, et al. 2003). Otro tipo de SNPs son los llamados “sinónimos” (o silenciosos) los cuales no alteran la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido (Duan J, et al. 2003). Según su localización en el genoma, los SNPs se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, localizados en regiones codificantes (exones); rSNP, localizados en regiones reguladoras; y gSNP, si están localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden ser sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP) (Cargill M, et al. 1999). (**Fig. 4**)

Dependiendo de la región donde se localicen, pueden afectar a la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción) en el caso de los rSNP; o bien afectar a intrones que modulan la estabilidad de la proteína, como es el caso de los iSNP ( Lin MT, et al. 2003; Betticher DC, et al. 1995).



**Fig. 4.** Clasificación de los diferentes tipos de SNP, de acuerdo con su localización en el genoma.

Fuente: (Cargill M, et al. 1999)

### Polimorfismo de alelo nulo:

Este polimorfismo consiste en que el alelo minoritario se caracteriza por la ausencia de la función asociada con el gen. Por tanto, el alelo nulo conduce a la ausencia de un determinado fenotipo, en oposición al producido por el alelo silvestre. El fundamento molecular de dicha incapacidad de generar el fenotipo suele ser la ausencia de un producto génico normal, ya sea por delección entera o parcial del gen o por algún polimorfismo puntual en su secuencia que lo incapacite para desempeñar su

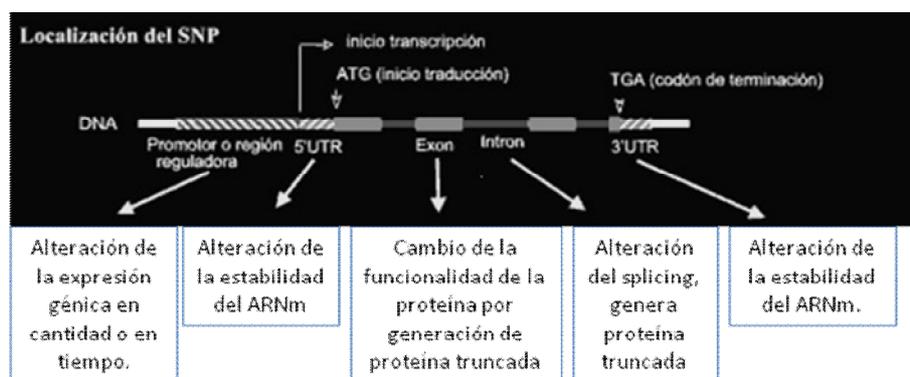
función biológica. A nivel fenotípico, la posesión de un alelo nulo en homocigosis es indistinguible de la delección absoluta del locus en el cromosoma (Griffiths AJF, 2000).

#### **Particularidades de los polimorfismos.-Haplotipos:**

Un nivel adicional de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuales consisten en posiciones polimórficas presentes en una misma región genómica y que son consideradas de forma conjunta. Estos haplotipos son de gran utilidad, ya que proporcionan información acerca de la recombinación, cuando se produce el intercambio físico del ADN durante la meiosis. Además permiten encontrar asociaciones estadísticas entre los genotipos de dos SNPs en el genoma, conocido como desequilibrio de ligamiento (una propiedad de los estudios de asociación entre el genoma humano). Este desequilibrio de ligamiento puede ser entendido como una co-segregación de dos posiciones polimórficas de forma que el conocimiento del genotipo en un SNP puede predecir el genotipo del otro SNP si la asociación (desequilibrio de ligamiento) es alta entre estos dos polimorfismos (Crawford DC, et al. 2005).

#### **Consecuencias fenotípicas de los polimorfismos**

La gran mayoría de los polimorfismos tienen efectos fenotípicos muy poco evidentes o incluso nulos. Sin embargo, algunos de estos, sobre todo del tipo SNP, pueden explicar la diferente susceptibilidad interindividual a la aparición de la enfermedad o las diferencias de respuesta a fármacos. De este modo estas variantes genéticas pueden condicionar la estabilidad del ARNm, la cantidad de proteína expresada y la secuencia de aminoácidos; considerándose la categoría más importante dentro de los cambios genéticos que influyen en la susceptibilidad a enfermedades comunes. Nueve de las diez principales causas de muerte tienen un componente genético y mayoritariamente este componente se debe a los SNPs (Gisbert Calabuig JA, et al. 2005). **(Fig 5)**



**Fig. 5.** Consecuencias de los polimorfismos en función de su localización en el gen.  
Fuente: (Gisbert Calabuig JA, et al. 2005)

Uno de los aspectos más importantes de los SNPs es su capacidad para influir en el comportamiento metabólico de las enzimas frente a xenobióticos (fármacos o tóxicos). Su estudio y conocimiento previo nos permite conocer las posibles consecuencias de un xenobiótico incluso actuar previamente para impedir la aparición de problemas o intoxicaciones (Cariaso M, et al. 2012).

Hemos de considerar los polimorfismos genéticos como un factor capaz de predecir las diferencias inter-individuales en la susceptibilidad a la enfermedad clínica. En particular, nos referimos a los polimorfismos que afectan a los enzimas de:

- Metabolismo de xenobióticos/cancerígenos (Clapper ML, 2000).
- Capacidad de reparación del ADN.
- Genes que controlan el crecimiento o la proliferación celular.

Las variaciones en el metabolismo de xenobióticos/carcinógeno han sido ampliamente investigadas y han demostrado claramente ser un importante factor determinante en la susceptibilidad individual de cáncer. Tales polimorfismos en enzimas que metabolizan xenobióticos son hereditarios, de manera que la aplicación moderna de fenotipificación metabólica y métodos de genotipificación de los estudios epidemiológicos ha proporcionado nuevos conocimientos sobre dichas interacciones gen-ambientales ( Au WW, 2001).

La afectación en la capacidad de reparación del ADN se ha asociado recientemente con una mayor susceptibilidad a numerosos tipos de cáncer; como los de piel, cerebro, pulmón, estómago, mama, vejiga, cabeza/cuello, y el colon (Quiñones L, et al. 1999). Cabe destacar que a pesar de la alta prevalencia poblacional para algunos de estos polimorfismos genéticos estos no confieren un alto riesgo individual de cáncer, por los que muchos tienen baja penetrancia (Kadlubar FF, 1994).

#### 1.4 FACTORES MEDIOAMBIENTALES EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER

En realidad la herencia y el ambiente son los extremos de un espectro en cuyo centro se sitúan las causas de la mayor parte de las neoplasias encontradas en el hombre (Weisburguer JH, 1990). Por tanto, en la etiología de los linfomas existen unos **Factores Genéticos**, en el que se incluye la herencia, y una serie de **Factores Medioambientales** como un conjunto de posibles causas externas desencadenantes de los procesos neoplásicos. No obstante, esta división de factores no excluye una interrelación entre ambos para la génesis del cáncer, porque en ocasiones es un factor genético en asociación con un factor ambiental el causante del proceso tumoral, es por ello que debemos incluir otra factor más que sería la **Interacción gen-ambiente** (Wogan GN, et al. 2004).

La primera referencia sobre la asociación entre la exposición a una sustancia y el desarrollo del cáncer data del año 1775 y fue escrita por el cirujano inglés Percival Pott (Pott P, 1993); el cual describe en sus observaciones:

*“A menudo, cuando llegan a la adolescencia, los deshollinadores que iniciaron su actividad durante los primeros años de su vida, muestran un cáncer cutáneo sobre los pliegues del escroto, porque allí se recoge y deposita el hollín”*

Es tal la repercusión de los factores medioambientales en nuestra salud que se ha estimado que en los países industrializados un 20 % de la incidencia total de

enfermedades puede atribuirse a factores medioambientales (Smith KR, et al. 1999); y un 80% de la génesis de los diferentes tipos de cánceres es debida a este tipo de causa.

En realidad existen numerosos factores medioambientales capaces de provocar o de facilitar el desarrollo del cáncer; algunos de estos existen de forma natural en el ambiente, tales como algunas radiaciones, microorganismos, sustancias químicas naturales producidas por organismos vivos, minerales como el asbesto o la radioactividad natural. Otros han sido producidos o incrementados por el impacto de las actividades del hombre sobre el ambiente: sustancias químicas artificiales, aditivos o pesticidas residuales en las comidas, drogas de abuso y medicamentos. El gran auge en los últimos años del desarrollo industrial ha ocasionado la aparición repentina en el curso evolutivo del ser humano de compuestos químicos con potencial tóxico o cancerígeno para los cuales el ser humano no cuenta con una maquinaria metabólica de detoxificación del todo eficiente. Algunas de estas sustancias serían los hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas organoclorados y organofosforados, piretroides, fármacos policlorinados bifenílicos y dioxinas, entre otros (Valavanidis A, et al 2006). Este hecho puede explicar, en parte, la asociación entre el grado de desarrollo de un país y la mayor incidencia de ciertas enfermedades como el cáncer.

La exposición puede ocurrir exógenamente cuando estos agentes están presentes en los alimentos, el aire o el agua; y también endógenamente cuando se trata de productos del metabolismo o estados fisiopatológicos en estados de enfermedad como inflamación o situaciones que generen un desequilibrio en el estado redox del individuo (Valavanidis A, et al 2006).

#### 1.4.1 SUSTANCIAS QUÍMICAS CON PODER CARCINOGENICO.

La denominación de las sustancias químicas con potencial carcinogénico se realiza en función de diferentes criterios. Las sustancias que no requieren activación se llaman *carcinógenos primarios* ó de acción directa, las sustancias que requieren activación metabólica se llaman *procarcinógenos*, las intermedias se llaman *carcinógenos*

*próximos* y aquellas que son responsables finales del efecto se llaman *carcinógenos finales*. Los carcinógenos químicos pueden ocasionar dos tipos de daño en el ADN: genotóxicos (iniciador) y no-genotóxicos (promotor), aunque esta diferenciación no es del todo exacta por el hecho de que ciertos químicos, en determinadas dosis, poseen ambas actividades.

#### Carcinógenos Genotóxicos:

Son sustancias que producen alteraciones en el material genético del huésped. Estos efectos se pueden resumir en mutaciones, formación de aductos y de aberraciones cromosómicas. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la acción carcinógena de estos agentes consiste en un aumento del potencial oxidativo de las células que ocasiona oxidación del ADN y/o formación de uniones covalentes de los agentes o sus metabolitos con las cadenas de ADN, formando lo que se conoce como aductos

. En cualquier caso, en la acción de este tipo de sustancias juega un papel fundamental el metabolismo celular, a través del cual se produce la biotransformación de sustancias en principio inocuas (procarcinógenos o carcinógenos próximos) a compuestos con capacidad genotóxica (carcinógenos finales), que realmente actúan como causantes de daño.

La acción de un agente carcinogénico debe acompañarse, para que ésta sea efectiva, de una descompensación en los mecanismos de reparación de ADN. Este sería el caso de los agentes inorgánicos, como el arsénico, cromo o níquel, que interfieren con enzimas relacionadas con la replicación del ADN alterando su funcionalidad. Esta acción cancerígena puede ser:

a) Directa, si no requieren activación y reaccionan con grupos nucleofílicos en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, el gas mostaza o los ácidos nítrico y sulfúrico diluidos en agua.

b) Indirecta, si requieren activación por enzimas. Como por ejemplo los hidrocarburos policíclicos aromáticos (benzopireno, cloruro de vinilo) y las aminas.

Carcinógenos Epigenéticos (no genotóxicos):

Son aquellos compuestos químicos que actúan por mecanismos que no incluyen la modificación directa del ADN sino que alteran la expresión de genes por modificación de los mecanismos de transcripción o traducción, dando lugar finalmente a células genéticamente inestables que pueden generar un tumor. En general, estos compuestos actúan modificando la fisiología normal de órganos y sistemas específicos produciéndose un exceso de estimulación cuyo resultado es una replicación celular intensificada (alteración del ciclo celular con efecto mitogénico). Esto puede dar lugar a un incremento de mutaciones espontáneas y de las probabilidades de alterar el ADN antes de que haya posibilidad de reparación. Normalmente se trata de compuestos exógenos, aunque en determinadas circunstancias también ciertos compuestos endógenos (hormonas) podrían considerarse como carcinógenos epigenéticos. Como ejemplos cabe citar los xenobióticos inmunosupresores, ciertas hormonas y promotores tumorales como el fenobarbital (Jones PA, et al. 2002).

#### 1.4.2 MECANISMOS DE DAÑO EN EL ADN

Estos mecanismos se llevan a cabo por un lado mediante la formación de aductos con el ADN; o bien a través la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

- **Especies reactivas del oxígeno (ROS):**

Es un término utilizado para describir los radicales libres derivados del oxígeno molecular. Estas moléculas reactivas, producidas como subproductos durante el transporte de electrones a través de la membrana mitocondrial en la respiración aeróbica o bien por las enzimas oxidorreductasas y por la oxidación catalizada por metales; tienen el potencial de causar una serie de eventos perjudiciales. La gran reactividad de las ROS se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas, como es el caso del ADN, en procesos de oxido-reducción. Entre estas moléculas podemos citar el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el

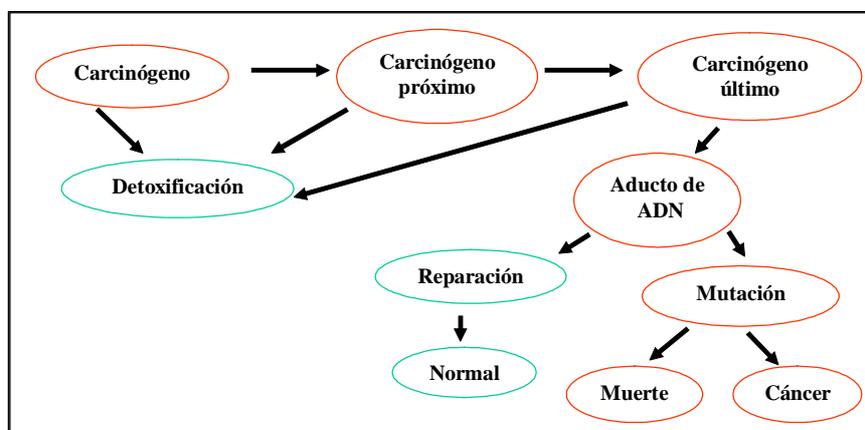
peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$  y el radical hidroxilo  $OH\cdot$ , que es el más reactivo. También pertenecen a las ROS, el óxido nítrico NO y el ácido nitroso  $HNO_2$ .

Las ROS se generan constantemente y se eliminan de la misma forma en el sistema biológico, manteniendo un equilibrio entre producción y eliminación. Por tanto, en condiciones fisiológicas normales, las células controlan los niveles de ROS al equilibrar su generación con su eliminación por el sistema de balance Redox (Dickinson BC, et al. 2011).

En situaciones de excesivo estrés ambiental por exceso de exposición a contaminantes, los niveles de ROS pueden aumentar dramáticamente. Esto puede generar un daño significativo a las estructuras celulares. Este tipo de situación se conoce como estrés oxidativo y, en ella, la presunción de que las ROS desempeñan un papel clave en el desarrollo de cáncer es cada día más clara, especialmente cuando la evidencia muestra que los antioxidantes previenen o retrasan la aparición de algunos tipos de cáncer. Las ROS han demostrado poseer muchas características de carcinógenos debido a su efecto mutagénico, por lo que podrían contribuir a la iniciación de cáncer. En el ADN las ROS pueden producir mutaciones de pares de bases, reordenamientos, deleciones, inserciones siendo el anión  $OH\cdot$  especialmente dañino (Epe B, et al. 1988). Así, la producción de ROS que causa daños, está en equilibrio con los mecanismos de reparación del ADN. El problema se genera en situaciones de desequilibrio, cuando los ROS pueden causar cambios de bases de ADN, rotura de las cadenas, inactivación en genes supresores de tumores y/o activación constitutiva de oncogenes (Rao GN, et al. 1993).

- **Formación de aductos con el ADN:**

La formación de aductos de ADN implica la unión de sustancias químicas mediante enlace covalente al ADN genómico. Cuando entran en contacto con el organismo, pasan a denominarse xenobióticos y pueden ejercer su acción como aductos directamente; o bien tras su metabolización (aductos indirectos) (Yang K, et al. 1998). La siguiente figura (**Fig.6**), muestra la conversión de un carcinógeno en un aducto de ADN y sus posibles consecuencias.



**Fig.6.** Esquema de actuación-metabolismo de los carcinógenos en el organismo.

Fuente: modificado de Devlin T, 2000

Existen numerosos tipos de sustancias químicas que ejercen sus efectos cancerígenos mediante la formación de aductos covalentes con bases del ADN. Entre ellos podemos citar las aminas aromáticas, las nitrosaminas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Hemminki K, et al. 2000) (**Tabla 5**). Todos ellos tienen grupos electrofílicos o grupos que se pueden convertir metabólicamente en electrofílicos como epóxidos o grupos hidroxilo. Además, algunos metales y compuestos organometálicos también forman aductos con el ADN.

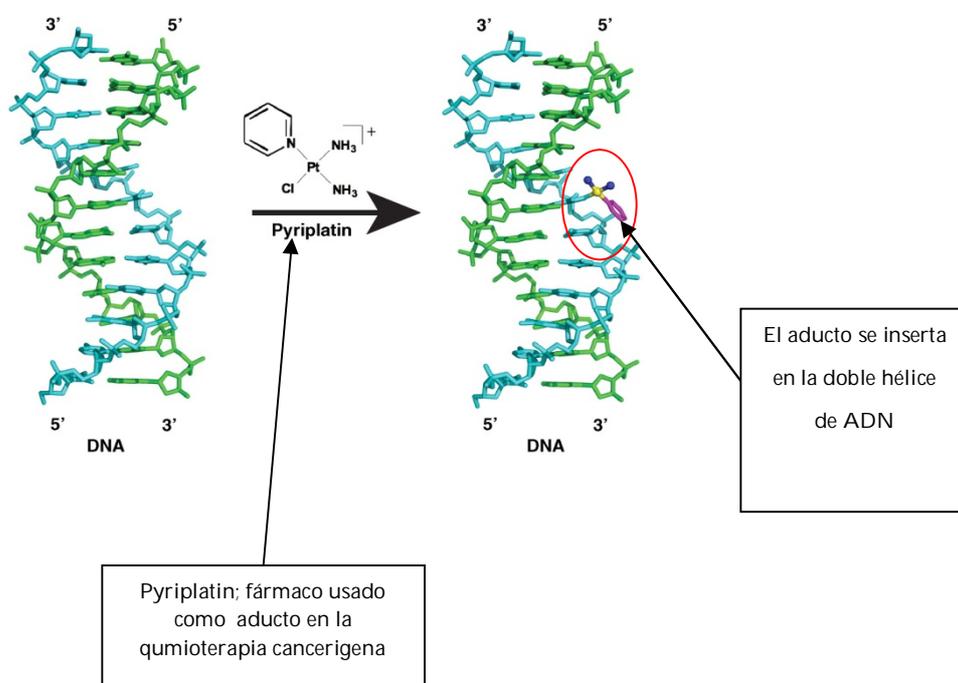
**Tabla 5.** Algunos de los carcinógenos con efecto aducto conocidos y sobre los que más se ha estudiado su posible efecto tanto in vivo como in vitro.

Carcinógenos humanos que actúan como Aductos del ADN			
Agente Carcinógeno	Aducto		
	In vitro	In vivo	
		Animal	Humano
Afaltoxinas	+	+	+
4-Aminobifenilo	+	+	+
Benceno	-	-	Nd
Bencidina	+	+	Nd
Clorambucil	+	Nd	Nd

Nitrosourea	+	Nd	Nd
Ciclofosfamida	+	+	Nd
Melfalan	+	Nd	Nd
Gas Mostaza	+	+	Nd
2-Naftaleno	+	+	Nd
Tiotepa	+	Nd	Nd
Clori-vinilo	+	+	Nd

Fuente: Modificado de Hemminki et al. 2000.

El efecto carcinogénico causado es directo, se insertan en la doble hélice por enlaces covalentes, provocan un cambio la estructura y la forma del ADN de manera que dificultan el marco de lectura (Sagi J, et al. 1998). (**Fig. 7**)



**Fig. 7.** Estructura del ADN vista mediante Rayos-X, inserción del Pyriplatin como aducto en la doble hélice.

Fuente: Modificado de (Wang D, et al. 2010)

## 1.5 EXPOSICION A TOXICOS

La exposición a tóxicos en la población puede llegar a ser uno de los principales factores que pueden interactuar de una manera multifactorial y secuencial para producir tumores malignos. Entre ellos destacan:

### 1.5.1 AGENTES BIOLÓGICOS.- INFECCIONES:

En numerosas ocasiones las infecciones víricas y, en menor número, las bacterianas, son causantes del posible desarrollo de enfermedades tumorales. Entre las más reseñables se encuentran:

- a) Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) - Herpes Virus. La infección conjunta puede ocasionar el Sarcoma de Kaposi. Es un tipo especial de cáncer que afecta al endotelio linfático, causado por una interacción entre el VIH, un sistema inmunitario debilitado y el herpes virus humano 8 (HHV-8) (Hengge UR, et al. 2002). El sarcoma de Kaposi ha estado vinculado a la diseminación del VIH y el HHV-8 a través de la actividad sexual.
- b) Virus de Epstein-Barr (VEB). El linfoma de Burkitt, es una forma de linfoma no Hodgkin de muy rápido crecimiento que se asocia con el virus de Epstein-Barr (VEB). El tipo africano del linfoma de Burkitt está estrechamente asociado con el VEB. También está asociado a la enfermedad linfoproliferativa tras el trasplante, así como linfoma de Hodgkin, el linfoma primario del Sistema Nervioso Central (SNC), linfomas en pacientes con VIH y el carcinoma nasofaríngeo (Johannsen E, et al. 1995). La incidencia y manifestaciones clínicas de la infección por el VEB varían dependiendo del grado de inmunocompetencia del individuo.
- c) Virus Hepatitis C (VHC). Aunque no se cuenta con pruebas de que el VHC sea un virus oncógeno, puesto que se trata de un virus RNA y no se integra al genoma de los hepatocitos, sólidas evidencias señalan que este virus promueve

- el desarrollo del hepatocarcinoma mediante la inducción de la actividad necro-inflamatoria y la cirrosis hepáticas (Donato F, et al. 1998).
- d) Virus del Papiloma Humano (VPH). Existe relación entre ciertos genotipos del VPH y el cáncer de cuello uterino (Hausen ZH, et al. 1975). Estos virus infectan células del epitelio cervical y producen unas oncoproteínas implicadas en la transformación e inmortalización celular. Los estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el VPH es el principal factor etiológico del cáncer cervical.
- e) *Helicobacter pylori*. Se trata de una bacteria relacionada con dos tipos de tumores:
- Cáncer de estómago: distintos estudios demuestran que personas infectadas con esta bacteria tienen hasta cuatro veces más probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer (IARC. 1994). Tanto es así, que hoy en día se considera que el desarrollo del adenocarcinoma gástrico es un proceso multifactorial, que en determinados casos se ve favorecido por la infección por *H. pylori*, junto con otros factores ambientales y genéticos.
  - Linfoma de células B del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT). Se trata de un subgrupo de LNH de bajo grado que se originan en sitios extraganglionares. Se mantienen localizados por largos periodos de tiempo y sólo ocasionalmente se diseminan a otros órganos, aparecen en el curso de alteraciones inflamatorias crónicas como en la infección por *Helicobacter pylori*. El desarrollo de linfomas tipo MALT se encuentra precedido generalmente por un proceso inflamatorio crónico. Inicialmente el tejido gástrico no contiene tejido linfoide asociado, pero con la inflamación se produce el reclutamiento de linfocitos hacia el sitio de inflamación formando tejido linfoide. Este proceso inflamatorio se considera que es la base para el desarrollo del MALT. La infección crónica por *H. pylori* en estómago se ha correlacionado con el desarrollo de este tipo de linfomas (Gisbert JP, 1998; Farinha P, et al. 2005). Por otro lado las especies de *Helicobacter* como el *H.*

*heilmannii* y el *H. felis* participan igualmente en la patogénesis de los linfomas gástricos MALT.

#### 1.5.2 RADIACIONES:

Las radiaciones son uno de los factores que más cambios provoca en el ADN y por tanto, pueden conducir a la génesis de un tumor. Existen dos tipos de radiaciones: las ionizantes y las no ionizantes. Las radiaciones no ionizantes, están representadas básicamente por radiación ultravioleta, presentan bajo contenido energético y no pueden atravesar la materia orgánica ni generar radicales libres. En cambio, interactúan con el ADN induciendo la formación de dímeros entre dos bases timinas vecinas e interfiriendo así con el proceso normal de replicación. Numerosos estudios relacionan este tipo de radiación con cánceres de piel tipo melanoma (Welsh MM, et al. 2008).

Las radiaciones ionizantes (radiación gamma, rayos X, neutrones y partículas cargadas) poseen en cambio un elevado poder energético y logran atravesar la materia orgánica viva ionizando a su paso átomos y generando radicales libres, siendo por tanto en extremo nocivos para la célula. La inducción de cáncer es el principal efecto tardío provocado por la exposición a la radiación ionizante. En la actualidad se ha adoptado la hipótesis conservadora de que cualquier dosis de radiación ionizante es capaz de inducir cáncer en las personas a ella expuestas (Yoon M, et al. 2010). De este modo son responsables de provocar entre otros:

-Epitelioma espino-celular cutáneo.

-Osteosarcomas: Por incorporación de radionúclidos con tropismo óseo, con dosis acumuladas en esqueleto superiores a 8 Gy.

-Leucemia: Es el cáncer radio-inducido más común. Es la patología estocástica más frecuente entre las víctimas de explosiones nucleares y exposiciones profesionales (Wogan GN, et al. 2004). Todas las formas de leucemia pueden ser radio inducidas salvo la leucemia linfática crónica.

### 1.5.3 SUSTANCIAS QUÍMICAS:

La exposición a carcinógenos ambientales químicos puede ocurrir en el lugar de trabajo, en el hogar, así como a través de los productos de consumo, tratamientos médicos, y estilos de vida. Existe evidencia de que la exposición a altos niveles de ciertas sustancias químicas está relacionada con el desarrollo de cáncer. Cada vez más pruebas científicas muestran que la exposición a bajos niveles de sustancias químicas en el medio ambiente en general contribuye al desarrollo de cáncer. Se estima que los factores ambientales como el humo del tabaco, la nutrición, la vida sedentaria y la exposición a carcinógenos ambientales son responsables de 75-80% de los casos de cáncer. Actualmente hay más de 6 millones de sustancias químicas cancerígenas, de las que 500.000 se utilizan en procesos de fabricación. Son numerosas las sustancias que pueden ocasionar daño en el ADN y por tanto desencadenen un proceso tumoral. De hecho existe una regulación europea que clasifica las sustancias químicas en función de su potencial carcinógeno (IARC-OMS, 1988). Las fuentes de muchos contaminantes ambientales, conocidos como carcinógenos potenciales, son muy variadas. Entre ellas destacan:

- Pesticidas: utilizados en la agricultura, la industria, el hogar y jardín, usados como desinfectantes, plaguicidas o conservantes de la madera.
- Productos químicos industriales, residuos y subproductos residuales de las instalaciones mineras, operaciones de fundición, fabricación de productos químicos y plantas de procesamiento, plantas petroquímicas e instalaciones de desechos médicos y municipales.
- Productos químicos en productos de consumo, incluyendo materiales de construcción, muebles y materiales de envasado de alimentos y cosméticos.
- Contaminación de las plantas eléctricas de carbón, gases de escape de automóviles y otras fuentes.

Existen diferentes clasificaciones de carcinógenos químicos: en función de su estructura química, de su mecanismo de acción, del efecto biológico sobre el ADN de los distintos grupos químicos que los componen o en función del tipo de actividades

humanas en que se generan o manipulan. Estas clasificaciones son realizadas por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), que forma parte de la Organización Mundial de la Salud o la Agencia de Protección Ambiental (Gray J, et al. 2009). En ella, cuando una sustancia ha sido clasificada como un carcinógeno, no significa que la exposición inmediata a la sustancia va a provocar desarrollo de cáncer. De la misma manera, una clasificación inicial de carcinogenicidad "probable" o "posible" indica que se sigue estudiando como sustancia causante de cáncer.

Los carcinógenos químicos se clasifican en función de su modo de acción en (Monographs WHO-IARC ,1988):

- Análogos de bases
- Agentes que reaccionan con el ADN
  - Agentes hidroxilantes o desaminantes de las bases nitrogenadas.
  - Agentes alquilantes.
- Agentes intercalantes que se introducen en la doble hélice del ADN, entre pares de bases consecutivas.

#### **Análogos de bases:**

Son moléculas químicas de estructura muy parecida a las bases nitrogenadas que conforman el ADN, de tal forma que son isómeros de las bases púricas o pirimidínicas. Se diferencian sólo en la posición de un grupo funcional (=tautómeros) (Delgado Cirilo A, et al. 2006). Una vez que se incorporan a la cadena de ADN, tienen propiedades de emparejamiento distintas de aquellas a las que han sustituido, de este modo pueden provocar mutaciones por incorporación incorrecta de nucleótidos durante la replicación. Un análogo de la base timina es el 5-bromouracilo (5-BU), que se incorpora en la cadena y puede reemplazar a ésta. Contiene bromo en la posición del carbono 5 en lugar del grupo CH<sub>3</sub>. La estructura normal (forma ceto) del 5-BU empareja con la adenina; sin embargo, el 5-BU puede cambiar con frecuencia a la forma

enol o a una forma ionizada que empareja con la guanina. Ésta última en otra replicación se apareará con su correspondiente citosina. Por lo tanto, habrá producido una transición de AT a GC.

### **Agentes que reaccionan con el ADN:**

Son moléculas que reaccionan directamente con el ADN ocasionando cambios químicos directos en las bases lo que provoca apareamientos incorrectos. Se dividen en:

- Agentes hidroxilantes o desaminantes: Son agentes que actúan mediante reacciones químicas con las bases nitrogenadas causando errores en el emparejamiento. O bien labilizan las bases, de modo que éstas espontáneamente se modifican químicamente con gran frecuencia. Pertenece a este grupo el ácido nitroso.

- Agentes alquilantes: Introducen radicales alquílicos en una cadena (los alquilantes mono-funcionales) o en las dos cadenas (los bi-funcionales) del ADN produciendo efectos mutagénicos. Algunos agentes alquilantes empleados en terapia son las mostazas nitrogenadas y sulfuradas, como por ejemplo

- bis-(2-cloroetil)-sulfuro:  $\text{Cl-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Cl}$
- etil-etano-sulfonato (EES):  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-SO}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$
- etil-metano-sulfonato (EMS):  $\text{CH}_3\text{-SO}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$
- nitrosoguanidina (NTG):  $\text{CH}_3\text{N(NO)C(=NH)NHNO}_2$  .....

Todos estos agentes, excepto la NTG, actúan tanto *in vivo* como *in vitro* (Villanueva JR, 2002).

### **Agentes intercalantes:**

Son moléculas planas que se insertan entre dos pares de bases del ADN, separándolas entre sí. Durante la replicación, esta conformación anormal puede

conducir a inserciones o deleciones en el ADN, originando mutaciones por desplazamiento del marco de lectura. Las sustancias más características de este grupo son las acridinas (naranja de acridina), bromuro de etidio y proflavina. Sustancias como el formaldehído, acetaldehído y acroleína que han sido detectadas en el humo del tabaco y de los automóviles también actúan como agentes intercalantes (Monographs WHO-IARC ,1988)

## **1.6 CARCINÓGENOS OCUPACIONALES**

La proporción exacta de casos de cáncer atribuibles a la exposición ocupacional no es fácil de determinar debido a que el conocimiento sobre la magnitud, duración y distribución de las exposiciones a carcinógenos específicos en la población es limitado. Sin embargo, es de esperar que la fracción de cánceres humanos atribuibles a una categoría particular de agente etiológico varíe entre regiones y a lo largo del tiempo. Se estima en la actualidad que las exposiciones ocupacionales son responsables del 1 al 20% de los casos de cáncer. Hay que resaltar que una gran proporción de carcinógenos conocidos se encuentran en ambientes de trabajo. Como en principio, las exposiciones ocupacionales pueden ser reguladas, minimizadas o eliminadas fácilmente, los carcinógenos ocupacionales son muy importantes en términos de salud pública por el potencial de prevención que tienen. La repercusión a nivel de salud es tal que las Agencias Internacionales para Investigación sobre el Cáncer (IARC, OMS) han elaborado numerosas monografías en cuanto al riesgo carcinogénico de sustancias químicas, mezclas complejas y procesos industriales (IARC-OMS, 1988). Dichas monografías incluyen revisiones científicas detalladas de la información epidemiológica y datos experimentales disponibles. De las muchas sustancias que se han encontrado en ambientes laborales y que se han identificado como causantes de procesos cancerosos, destacan:

1.6.1 Arsénico y derivados

1.6.2 Asbestos

### 1.6.3 Oxido de Etileno

### 1.6.4 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

### 1.6.5 Aminas Aromáticas

#### 1.6.1 ARSÉNICO Y DERIVADOS:

El arsénico es un elemento traza natural que se encuentra en el medio ambiente y abunda en el suelo como mineral.

**-Utilidad y exposición:** El mayor uso actual del arsénico se encuentra en la fabricación de plaguicidas y pesticidas (AETOX, 1996):

El trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ) se usa como desparasitario en el ganado.

El arsenito cálcico es usado como germinicida para combatir los moluscos (caracoles) en algunos cultivos, también es usado para eliminar el gorgojo en muchas plantas.

El arsenito sódico es un buen acaricida y combate la escoriosis de la vid durante el invierno.

Se ha utilizado arseniato de plomo para el tratamiento de las viñas y combatir los gusanos de los árboles frutales (manzano, etc.). Aunque existen muchas aplicaciones que vamos a comentar, el arsénico se usa también como pigmento de color verde.

También en la industria minera es frecuente el contacto con el arsénico siendo la principal fuente la arsenopirita que por oxidación libera arsénico al ambiente local. En algunas áreas mineras existen problemas importantes con el drenaje ácido usado para el lavado de productos mineros, en estos casos los valores de pH pueden ser extremadamente bajos de modo que se favorecen la liberación del arsénico. Además los derivados compuestos de arsénico son usados para preservar la madera, por ejemplo se usan en la industria naval para pintura de barcos.

- La **exposición** al Arsénico puede producirse por:

Ingerirse en pequeñas cantidades en alimentos, agua o aire contaminados con arsénico. Respirar el humo de serrín o la quema de madera tratada con arsénico para

preservarla. Vivir en un área con altos niveles de arsénico en las rocas o cerca de explotaciones mineras.

- **Efecto sobre la salud:** El As es uno de los primeros agentes químicos con evidencia de su capacidad carcinogénica en humanos. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC-OMS, 1988), lo clasificó en el Grupo I, agente cancerígeno comprobado.

La exposición ambiental y ocupacional al arsénico se asocia con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer de piel, vejiga urinaria, y los cánceres de las vías respiratorias. Los mecanismos responsables de la carcinogénesis de arsénico no se han establecido (Simeonova PP, et al. 2000).

#### 1.6.2 ASBESTOS

Los asbestos, también llamado amianto, es un grupo de minerales metamórficos de consistencia fibrosa. Están compuestos de silicatos de cadena doble. Los minerales de asbesto tienen fibras largas y resistentes que se pueden separar y son suficientemente flexibles como para ser entrelazadas y resistir altas temperaturas.

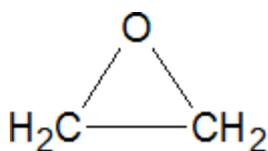
-**Utilidad y exposición:** Debido a estas especiales características, el asbesto se ha usado para una gran variedad de productos manufacturados, principalmente en materiales de construcción (tejas para recubrimiento de tejados, baldosas y azulejos, productos de papel y productos de cemento con asbesto), productos de fricción (embrague de automóviles, frenos, componentes de la transmisión) y materias textiles termo-resistentes. Su uso en la industria de refinería de petróleo y en los astilleros es frecuente debido a sus propiedades citadas como material de aislamiento y revestimiento de tuberías tanques de almacenaje, calderas y hornos.

- **Efecto sobre la salud:** Se ha determinado por los organismos médicos internacionales que los productos relacionados con el asbesto/amianto provocan cáncer con una elevada mortalidad y por ello, desde hace décadas, se ha prohibido su uso en todos los países desarrollados, aunque se continúa utilizando en algunos países en vías de desarrollo. Existen dos tipos de cáncer producidos por

exposición al amianto: cáncer del pulmón y mesotelioma (Gibbs GW, et al. 2008; Gil Hernández F, 2005). No se reconoce una cantidad mínima del agente causal por debajo de la cual un expuesto pueda considerarse seguro. El cáncer de pulmón en trabajadores expuestos llega a ser hasta 10 veces más frecuente que en la población general (Joshi TK, et al. 2004).

### 1.6.3 OXIDO DE ETILENO

El óxido de etileno es una de las materias primas más importantes utilizadas en la producción química. Es producido a gran escala por la oxidación del etileno, que es un derivado petroquímico del petróleo. El óxido de etileno es un gas que, a temperatura y presión normales, tiene una densidad superior a la del aire y es soluble en agua (Coggon D, et al. 2004). Es incoloro, inflamable, tóxico y es el epóxido más importante usado en la industria. (Fig. 8)



**Fig. 8.** Estructura básica del óxido de etileno.  
Fuente: Gil Hernández F, 2005

- **Efectos sobre la salud:** Existe evidencia de una asociación entre la exposición al óxido de etileno y el desarrollo de cánceres hematológicos, aunque es difícil establecer conclusiones definitivas ya que no se ha llevado a cabo suficiente experimentación en humanos. En cambio, se ha demostrado la actividad carcinogénica del óxido de etileno en animales de experimentación, pudiéndose afirmar que es un agente alquilante y encontrándose diferentes evidencias (INCHEM, 1999):

- Existe relación dosis-efecto. El persistente aumento en la dosis, repercute en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los linfocitos periféricos y micronúcleos en células de médula ósea de los trabajadores expuestos. Se asocia con la aparición de tumores malignos del sistema linfático y hematopoyético, tanto en humanos como en animales experimentales.

- Induce un aumento de la frecuencia de aductos de hemoglobina relacionado con la dosis en las personas expuestas, a su vez correlacionados con el número de aductos en el ADN.

- Induce mutaciones genéticas y hereditarias, translocaciones cromosómicas en células germinales de los roedores expuestos.

- Por ultimo; es un mutágeno potente y clastógeno, como tal produce rotura de fragmentos de ADN con la consecuente ganancia o pérdida de fragmentos cromosómicos (NTP, 2011).

Los pocos estudios en humanos demuestran que es carcinogénico y cómo tal es clasificado por la IARC. Su exposición laboral u ocupacional ha sido descrita como causante de enfermedades oncohematológicas (Coggon D, et al. 2004).

#### 1.6.4 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PHAs)

Son un grupo de sustancias poliméricas derivadas del benceno, se generan en la pirolisis o combustión incompleta de materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno. Por tanto, se forman como producto de la combustión de petróleo y de otros materiales biológicos como el tabaco, carnes a la brasa y por combustión incompleta de combustibles fósiles (carbón y gasolina). Forman aductos con bases púricas, especialmente guanina, pero únicamente tras la activación enzimática a carcinógeno próximo o último.

##### **- Utilidad y Exposición:**

Además de su uso como combustible en la gasolina o carbón, tanto el benceno como sus derivados tienen múltiples usos. La exposición humana a estos compuestos es directa y se puede dar por inhalación, ingestión o contacto directo por la piel. Tras la absorción se distribuyen por diversos órganos y tejidos, en especial los tejidos ricos en lípidos.

##### **- Efectos sobre la salud:**

No todos los PHAs han mostrado poseer efectos carcinogénicos, genotóxicos o mutágenos. El efecto se atribuye a la presencia conjunta de más de un compuesto de la familia y de algunos de sus derivados, principalmente los nitroderivados (Stellman JM, et al. 1998; Ellehorn MJ, 1997). (**Tabla 6**)

**Tabla 6.** Datos relativos a los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos PHAs.

PAHs	Carcinogenicidad	Genotoxicidad	Mutagenicidad
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzo[fluoreno]	I	I	?
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo [e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Dibenz[a]antraceno	S	S	+
Benzo[ghi]perileno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+
2-Nitronaftaleno	N	L	-
1-Nitropirano	I	S	+

(S= suficiente; I= insuficiente; N= no carcinogénico; L= limitados.)  
Mutagenicidad (Test de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconcluso).

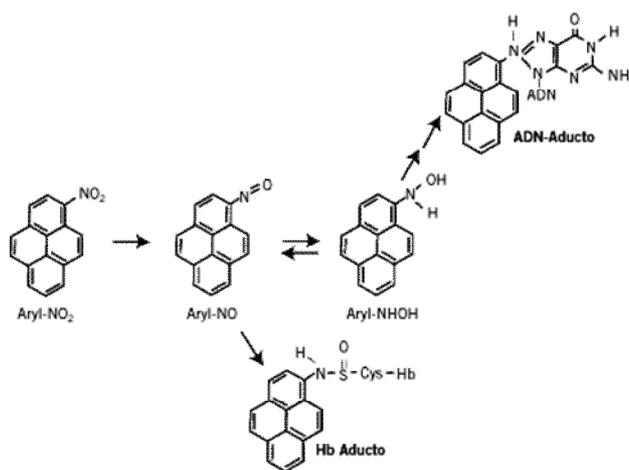
Fuente: Modificado de (Stellman JM, et al. 1998).

Hoy en día se admite que los PHAs deben ser previamente activados en el organismo antes de ejercer su efecto como disruptor endocrino o cancerígeno/mutágeno (Ellenhorn MJ, et al. 1997). Se ha observado que la exposición prolongada se asocia con el desarrollo de cáncer de varios tipos: cutáneos, cáncer broncogénico de vías respiratorias, cáncer de vejiga y en el sistema hematopoyético pueden originar leucemia y linfoma. Muchas de estas sustancias también tienen efecto negativo sobre el sistema inmunológico, característica que parece estar asociada a la capacidad carcinogénica (Jones SA, et al. 2000).

#### - Reacciones con el ADN:

Los Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs), de los cuales benzo[a]pireno (Bap) es su miembro más representativo y con mayor potencial carcinogénico, tienen la capacidad de formar aductos con ADN (Neumann HG, et al. 1995). Esta unión de los metabolitos electrofílicos de los PHAs al ADN parece ser un paso clave en la iniciación

del cáncer (Perera FP, et al. 2005). En general la metabolización de estos hidrocarburos origina diferentes compuestos químicos, entre ellos producen epóxidos secundarios (di-hidrodiolepóxidos), que son las formas más reactivas con el ADN. El carbono benzílico de los dihidrodiolepóxidos es capaz de reaccionar con las porciones nucleofílicas del ADN, fundamentalmente con guanidina, y eventualmente iniciar un proceso mutagénico (Santella RM, et al. 1992) (**Fig. 9**). La formación de aductos también se observa con otras macromoléculas como son las proteínas (por ejemplo, hemoglobina o albúmina).



**Fig. 9.** Activación metabólica del 1-nitropireno y la formación de aductos de ADN y hemoglobina.

Fuente: Neumann HG, et al. (1995).

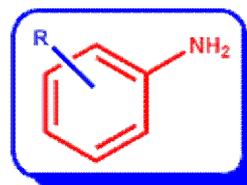
Los efectos genotóxicos de los PHAS se han evidenciado por su relación con aberraciones cromosómicas en linfocitos de sangre periférica (Bonassi S, et al. 2000; Beskid O, et al. 2007).

Los aductos en las células blancas de la sangre son usados como un dosímetro biológico y marcador de riesgo potencial debido a que son un reflejo de la variación individual en la exposición, la absorción, la activación metabólica y la reparación del ADN (Veglia F, et al. 2003).

### 1.6.5 AMINAS AROMÁTICAS

Otro grupo de sustancias con potencial carcinógeno son las aminas aromáticas; que derivan del amoníaco por sustitución de los átomos de hidrógeno por radicales arilos (**Fig. 10**). Son numerosas las moléculas de este tipo entre las que se encuentran:

- Anilina.
- 4-Aminodifenilo
- Bencidina (y sus colorantes derivados)
- Beta- Naftalina
- Magenta
- Cloro-orto-Toluidina
- Orto-Toluidina
- Auramina
- P-Cloro Anilina
- 4-Cloro-Orto-Feneillendiamina
- 3,3-diclorobencidina



**Fig. 10.** Estructura general de las aminas aromáticas.

Fuente: (Morrison RT, et al. 1992).

#### - Uso y exposición:

El uso más extendido de las aminas es en la industria del tinte como colorante. La principal clase de aminas son los colorantes azoicos, que se obtienen por diazotización, un proceso mediante el cual se hace reaccionar una amina aromática primaria con ácido nitroso en presencia de un exceso de ácido mineral para producir compuestos diazoicos (-N=N-). Otra importante clase de colorantes a base de trifenilmetano, se obtiene también a partir de aminas aromáticas.

Las aminas, además de utilizarse como compuestos químicos intermedios en la industria de los colorantes, algunos de estos productos se utilizan en las industrias de productos farmacéuticos, tejidos, peletería, peluquería y fotografía. Son sustancias que se forman en la superficie de las carnes y pescados ahumados por interacción entre aminas naturales y nitritos añadidos como conservantes. Sin embargo, su presencia mayoritaria está en el tabaco y productos derivados. Actualmente se conoce que los

efectos carcinógenos de las nitrosaminas están relacionados con los mecanismos bioquímicos que las activan como son las oxidasas microsomales de función mixta.

**- Efectos sobre la salud:**

La IARC ha evidenciado las relaciones entre las aminas aromáticas y riesgo de cáncer en seres humanos causadas por exposición laboral o por exposición al humo del tabaco. En particular colorantes basados en bencidina y moca (4,4'-metileno-2-chloroaniline) se consideran "probables" cancerígenos, debido a un alto nivel de evidencia experimental en animales.

Existe además evidencia creciente de que el aumento de incidencia de cáncer de vejiga en los fumadores es atribuible a aminas aromáticas (Baena AV, et al. 2006), más que a otros contaminantes del humo del tabaco como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Vineis P, 1997). La exposición ocupacional es sin duda una de las principales causas de este tipo de cáncer. Una de las causas clásicas de cáncer de vejiga es la exposición a aminas aromáticas cancerígenas, especialmente bencidina y la beta-naftil-amina. Tales exposiciones estaban relacionadas con los lugares de trabajo en la industria química. El cáncer de vejiga relacionado con exposición ocupacional ha sido observado en los tintoreros, pintores y peluqueros. En estas ocupaciones, la exposición a mezclas complejas de sustancias que contienen los productos de combustión o nitrosaminas es común.

El mecanismo carcinogénico es por formación de aductos con el ADN, principalmente con el carbono 8 de la guanina dando N-(deoxyguanosin-8-Phenyl) (dGC8), que parece que activaría al oncogén cH-RAS (Wiseman H, et al. 1996).

Cada vez existen más evidencias de que la exposición a las aminas aromáticas está relacionada con el desarrollo de varios tipos de tumores y no exclusivamente el de vejiga (Koutros S, et al. 2009; Thompson PA, et al. 2002; Kadlubar FF, 1994).

## 1.7 DEFENSA FRENTE A TOXICOS.-METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

El metabolismo tiene como objetivo, entre otros, la protección del organismo frente a posibles agresiones de sustancias que puedan ocasionar daño. Esta función es de vital importancia debido al número cada vez más creciente de sustancias con potencial tóxico; este tipo de sustancias es conocido con el nombre de xenobiótico (XB), cuya palabra deriva del griego "xeno" ("extraño") y "bio" ("vida"). Se aplica a los compuestos cuya estructura química en la naturaleza es poco frecuente o inexistente ya que son mayoritariamente producidos por el hombre en actividades industriales o cotidianas. La mayoría han aparecido en el medio ambiente durante los últimos 100 años. Debido a su estructura inusual y su gran estabilidad, algunos xenobióticos persisten mucho tiempo en la biosfera sin alterarse y por eso se dice que son resistentes a la biodegradación, llegando a ser contaminantes. Esto hace que la maquinaria metabólica de los seres vivos actúe más lentamente sobre estos compuestos.

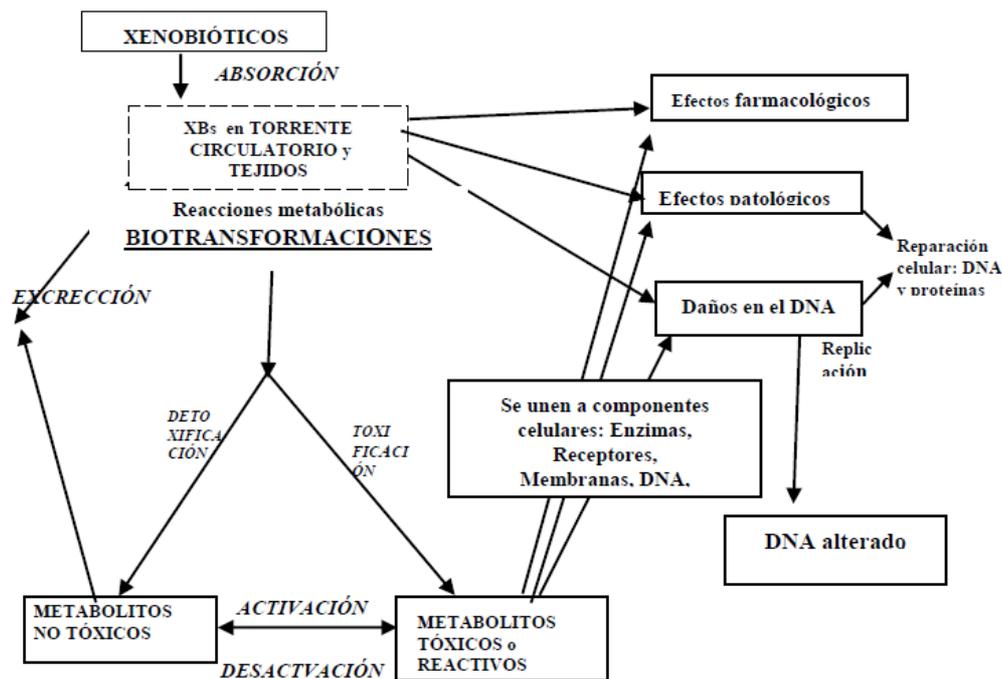
Todos los organismos se encuentran constantemente expuestos a compuestos y elementos químicos de este tipo y que son dañinos si se acumularan en sus células. Los xenobióticos como las drogas sintéticas, los venenos naturales y los antibióticos son detoxificados por un conjunto de enzimas xenobióticas-metabolizadoras (Connors KA, 1998; Poter R, et al. 1998).

Las biotransformaciones pueden inducir considerables cambios en la actividad biológica de los XBs, pudiéndose darse dos situaciones (**Fig. 11**):

- Que la actividad disminuye, el proceso se denomina de bioinactivación (detoxicación).

- En el caso de que la actividad aumente, se denomina bioactivación (activación). En estos casos los efectos tóxicos de los compuestos exógenos no provienen de los compuestos patrón sino de los metabolitos reactivos formados a partir de ellos dentro de las células. Estas biotransformaciones de compuestos relativamente inertes a metabolitos muy reactivos con una toxicidad intrínseca mayor

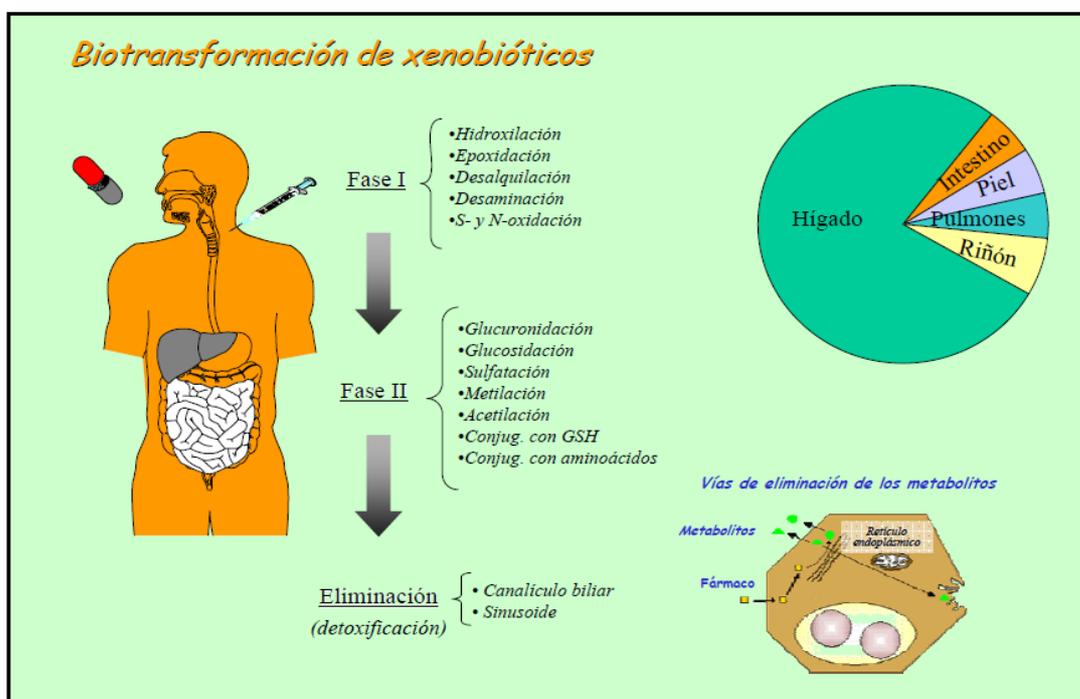
que la de los compuestos originales se denominan activación metabólica, bioactivación o toxificación.



**Fig.11.** Esquema de las posibles biotransformaciones de un xenobiótico una vez ingresado en el organismo  
Fuente: (Testa B, et al 2008).

### 1.7.1 REACCIONES DE BIOTRANSFORMACIÓN:

El proceso de metabolización ocurre en tres etapas; Inicialmente tienen lugar reacciones químicas de los xenobióticos directamente (fase I); a continuación se producen reacciones de conjugación con grupos que los hacen más solubles en agua (fase II), por último, el xenobiótico modificado puede entonces ser excretado (fase III). (Fig. 12)



**Fig. 12.** Esquema de las reacciones de metabolización de xenobióticos en el ser humano.

Fuente: (Castell JV, et al. 2008)

- **Reacciones de Fase I:**

Las reacciones involucradas en el proceso de metabolización son múltiples y diversas. Hablamos de reacciones de *oxidación* y *reducción*, que alteran o crean nuevos grupos funcionales, así como reacciones de *hidrólisis*, que rompen enlaces ésteres y amidas liberando también nuevos grupos funcionales (Repetto M, 2009).

- **Oxidación:** el 80% de los xenobióticos sufre oxidación, tiene lugar sobre todo en el hígado, aunque también en la mucosa intestinal, en el riñón y en el pulmón. Estas reacciones las llevan a cabo el sistema de enzimas citocromo p-450. Las reacciones de oxidación se producen preferentemente en la fracción microsómica del hígado y de otros tejidos y, en menor grado, en la mitocondrial.

- **Reducción:** son menos importantes, las llevan a cabo los mismos sistemas enzimáticos (citocromo p-450) y precisan bajas concentraciones de oxígeno. Suelen llevarse a cabo en la fracción microsómica de los hepatocitos.
- **Hidrólisis:** las llevan a cabo esterasas y proteasas. Las esterasas las encontramos en el plasma; y las proteasas son enzimas ubicuas, pudiendo ser ectoenzimas (enzimas de la membrana celular) o proteasas plasmáticas.

### **El sistema Citocromo p-450 (CYP450)**

Los enzimas que lo conforman, cuando están reducidos absorben luz a una longitud de onda de 450 nm, de ahí su nombre. Engloba varias familias de citocromos P, en el metabolismo de los xenobióticos encontramos a las familias 1, 2 y 3 (CYP1, CYP2 y CYP3). Dentro de cada familia encontramos subfamilias que se denominan con letras y dentro de las subfamilias encontramos isoformas que se designan con número (Park BK, et al. 1995).

Son enzimas del retículo endoplasmático liso y su mecanismo de acción es el siguiente: en primer lugar la molécula de hierro presente en la enzima ha de estar en forma de férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), se atrapa el sustrato a metabolizar formándose el complejo citocromo-xenobiótico. Posteriormente, un electrón es transferido al átomo Fe, pasando éste a su estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ). A continuación se combina con oxígeno, se forma un complejo citocromo-xenobiótico-oxígeno, que sufrirá una segunda reducción por acción del NADPH. Este intermediario pierde una molécula de agua dejando un complejo  $(\text{FeO})^{3+}$  que directamente oxida el sustrato. Por último el xenobiótico se libera oxidado, quedando de nuevo el citocromo en forma de  $\text{Fe}^{3+}$ . En definitiva, los productos resultantes tienden a ser compuestos polares, hidrosolubles y están preparados para reacciones de conjugación de la fase II.

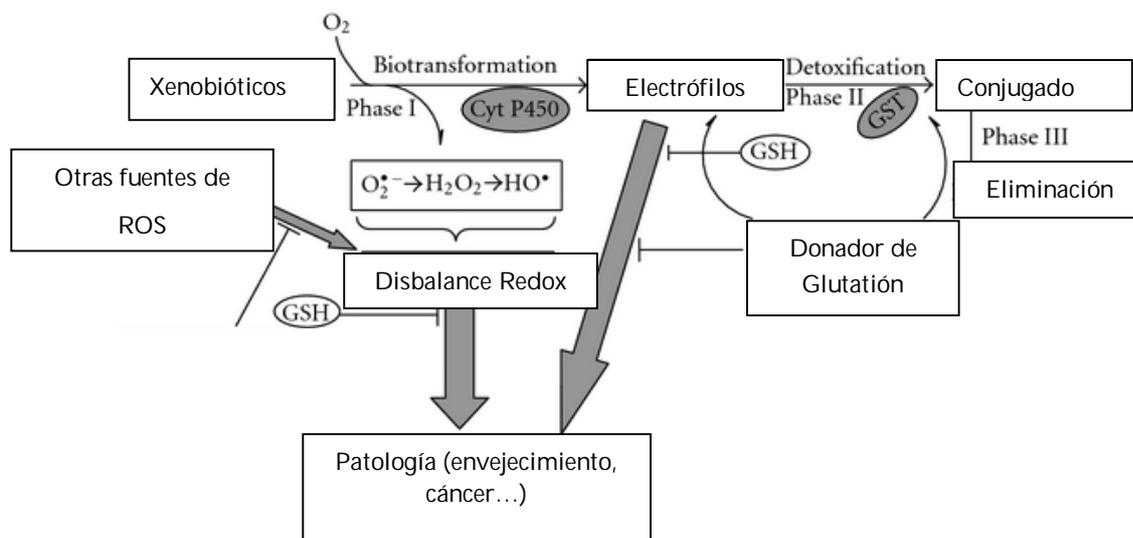
- **Reacciones de fase II:**

Son conocidas también como reacciones de conjugación, su objetivo es obtener sustancias más polares para facilitar la excreción por orina o por bilis. Tiene lugar con metabolitos resultantes de la fase I, aunque puede darse reacción de fase II sin necesidad de la fase I.

- **Conjugación con Acido Glucurónico:** Las enzimas que llevan a cabo estas reacciones son las glucuronosil transferasas (UGTs), de dos tipos UGT1 y UGT2. Transfieren ácido glucurónico a algún metabolito procedente de la fase I, o bien pueden actuar sobre xenobióticos o sustancias endógenas que no han sufrido reacción previa.

En general, los glucurónidos, productos resultantes, son más solubles en agua que el compuesto del que proceden y así pueden ser más fácilmente excretados por la orina o por la bilis. A menudo son poco o nada activos, pero en ocasiones pueden ser farmacológicamente más activos que el fármaco original (Burchell B, et al. 1995). Asimismo, la reacción de glucuronidación puede originar un aumento en la toxicidad del xenobiótico original, ya que los glucurónidos formados pueden ser compuestos electrófilos que se pueden unir de manera covalente al ADN o ARN, produciendo respuestas inmunológicas o induciendo procesos de teratogénicos y/o carcinogénicos (Guengerich FP, 1992).

- **Conjugación con Glutación:** Es la reacción de transferencia de glutación (GSH) a diferentes sustancias. El glutación es un tripéptido formado por "glutamil-cisteinil-glicina"; presenta un grupo SH libre (tiol), que es el responsable de las propiedades antioxidantes de esta sustancia, protegiendo a las células de los ataques de los peróxidos y radicales libres (Awasthi YC, et al. 1994). Además, el grupo tiol es capaz de conjugarse con muchas sustancias que contengan grupos electrofílicos, de manera que el glutación juega un papel muy importante en la detoxificación (Cascinu S, et al. 1995).



**Fig. 13.** Papel del glutatión en la detoxificación de xenobióticos y especies ROS como responsable del mantenimiento de equilibrio redox.

Fuente: Modificado de (Devlin 2000)

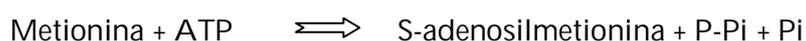
Por tanto, el GSH es un fuerte nucleófilo que inactiva sustancias electrófilas fuertes, como son algunos carcinógenos, mediante la formación de conjugados catalizados por las glutatión transferasas (GST) (**Fig. 13**). Los sustratos sobre los que actúan las GSTs comprenden epóxidos, alquenos y compuestos de carbono electrófilo, azufre o los centros de nitrógeno (Gulick AM, et al. 1995). Hay dos tipos de reacción de conjugación con glutatión:

- reacciones de desplazamiento: en el que el glutatión desplaza a un grupo atrayente de electrones (electrófilo).
- reacciones de adición: en este caso el glutatión se añade para activar estructuras de enlace doble o sistemas cíclicos tensas.

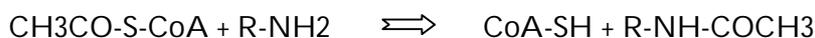
- **Conjugación con Sulfatos:** La conjugación con sulfato es una vía importante de la biotransformación de grupos fenólico y de grupos hidroxilo alifáticos, así como de ciertos neurotransmisores, ácidos biliares e hidroxilaminas orgánicas. Las enzimas responsables de la conjugación con sulfato son las sulfotransferasas; la reacción consiste en la transferencia de un grupo sulfato de PAPS (3'-fosfoadenosil-5'-

fosfosulfato) a un grupo hidroxilo o amino en el xenobiótico. Las sulfotransferasas son enzimas solubles localizadas en el citosol. El producto de la reacción es un sulfato orgánico ionizado, muy soluble en agua que se excreta en la orina. La reacción se lleva a cabo en el hígado y requiere una activación previa iones sulfato (Koolman J, 2012).

- **Conjugación de grupos metilo:** Consiste en la adición de radicales metilo a moléculas farmacológicas o xenobióticas, mediante la intervención de las metiltransferasas que se encuentran en muchos tejidos: hígado, glándulas suprarrenales, cerebro entre otros. El grupo metilo ha de ser previamente activado en forma de S-adenosilmetionina (SAM) (Koolman J, 2012).



- **Reacciones de Acilación:** Consiste en la incorporación de un radical acilo (a menudo, acetilo) a los radicales amino o carboxilo del xenobióticos, por las aciltransferasas y catalizado por derivados de la coenzima A (CoA-SH). Existen diferentes tipos de acilación, aunque la más importante es la acetilación de aminas a partir del acetil-S-CoA; que es específico de aminas alifáticas y aromáticas, sulfamidas, hidracinas e hidrazidas. El proceso es catalizado por N-acetiltransferasa y requiere la acetilación previa de N-acetiltransferasa:



Las N-acetil transferasas se encuentran en muchos tejidos: hígado (tanto hepatocitos como células retículo endoteliales), células de mucosas gastrointestinal, u otros tipos de mucosas. La actividad de estas enzimas depende en gran medida de factores genéticos, que dan origen a acetiladores rápidos y acetiladores lentos; por ejemplo, acetilación de la isoniazida (Mendoza Patiño N, 2008).

### 1.7.2 FACTORES QUE MODIFICAN LA BIOTRANSFORMACIÓN:

Los mecanismos de biotransformación de sustancias tóxicas pueden verse alterados por diferentes factores. Esta alteración puede provocar, normalmente, una disminución de las capacidades de transformación aunque en algunos casos puede provocar un aumento de dicha capacidad. Así se explica que sean los procesos de biotransformación los principales responsables de las variaciones interindividuales en los niveles plasmáticos tras una misma dosis de exposición o dosis de fármaco y de las variaciones en el curso del tratamiento en un mismo enfermo. Podemos clasificar estos factores en diferentes grupos:

- **Factores fisiopatológicos:**

Son numerosos los factores o situaciones que pueden cambiar el estado metabólico de un individuo, entre ellos hay que destacar la edad, el sexo, estado nutricional y la existencia de determinadas enfermedades, especialmente hepatopatías.

**Edad.** Es un factor muy variable e irregular, no sólo en relación con el tipo de reacción metabólica, sino, dentro de una misma reacción, también varía con el tipo de sustrato y el órgano estudiado. En general se puede decir que al nacer nuestra capacidad es limitada y va aumentando hasta alcanzar un máximo en los primeros años de edad adulta; pero esta va disminuyendo progresivamente hasta la vejez. En el anciano la menor capacidad biotransformante es debida, en parte, a la disminución de la dotación enzimática en el hígado y, en parte, a la reducción del flujo hepático. A ello se debe sumar la clara reducción en la función renal que existe en la mayoría de los ancianos. Ambos factores contribuyen a aumentar la vida media biológica del fármaco/xenobiótico y el riesgo de acumulación tóxica (Repetto M, 2009).

**Sexo.** Está demostrado que las hormonas sexuales desempeñan un importante papel en el metabolismo de los tóxicos, porque los estrógenos favorecen la síntesis de diferentes enzimas, como las de metabolismo de xenobióticos. Así, el estado hormonal influye

sobre la actividad de ciertas enzimas microsómicas. Como ejemplo tenemos que la testosterona reduce la vida media de la antipirina por provocar su metabolismo; los anabolizantes aumentan los niveles de oxifenbutazona por inhibición de la glucuronidación; los anticonceptivos orales inhiben el metabolismo de la antipirina y de la fenilbutazona; los gestágenos provocan el metabolismo de la testosterona (Repetto M, 2009).

**Alteraciones patológicas.** Los procesos de metabolización se alteran en situaciones en que el hígado se ve intensamente afectado, si bien el grado de alteración varía según el tipo de reacción metabólica. En general las enfermedades hepáticas, ya sean por causa de agentes víricos (Hepatitis, Cirrosis Hepáticas y enfermedades similares) o por sustancias hepatotóxicas (fármacos, alcohol, entre otros) provocan disminución en la capacidad biotransformante de este órgano.

**Estado nutricional o dieta:** La influencia de la dieta sobre el metabolismo de fármacos depende de varias causas (Repetto M, 2009):

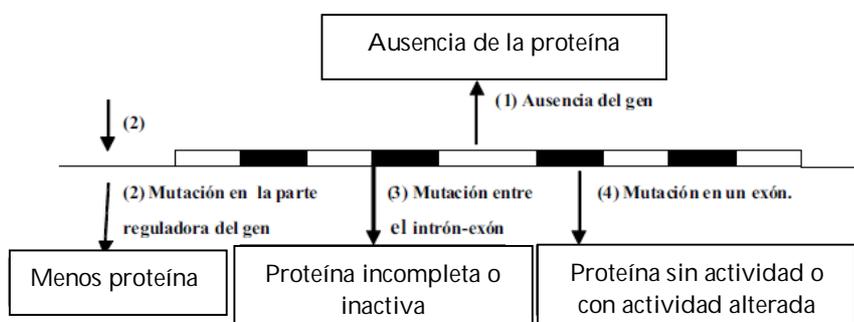
- a) La presencia de contaminantes que tengan capacidad de provocar o de inhibir enzimas biotransformantes (insecticidas o benzopireno);
- b) El equilibrio de los principios inmediatos en la dieta que puede influir sobre la flora digestiva y su capacidad de metabolizar ciertos xenobióticos, y
- c) El tipo o hábito de dieta, que influye sobre la capacidad biotransformante de una particular dotación enzimática de un individuo.

**Influencias ambientales.** Son numerosos los factores ambientales que afectan al metabolismo provocando inducción o inhibición enzimática a la hora de metabolizar sustancias xenobióticas.

- **Factores genéticos.-Polimorfismos genéticos.**

Ya hemos citado los polimorfismos como un punto esencial en la modificación de la capacidad de metabolización, la diversidad genética interindividual puede ser

responsable que la actividad de las enzimas sea diferente en la población. Actualmente conocemos polimorfismos genéticos que influyen en la expresión y activación de las enzimas tanto de fase I como de fase II que son las encargadas de metabolizar los tóxicos (Villanueva JR, 2002) (Fig.14). Precisamente en ello radica la diferente farmacocinética de muchos medicamentos responsables en último término de variaciones en la eficacia y la aparición de reacciones adversas al tratamiento. Cuando se trata de xenobióticos estos polimorfismos enzimáticos pueden ser responsables de la distinta susceptibilidad a desarrollar ciertas enfermedades como consecuencia del efecto tóxico de estos compuestos.



**Fig. 14.** Repercusión de los diferentes polimorfismos genéticos que condicionan el funcionamiento anormal de las enzimas

Fuente: (Dart RC, 2004).

## 1.8 ENZIMAS DE METABOLIZACIÓN DE TÓXICOS

Son numerosos los sistemas enzimáticos encargados de metabolizar xenobióticos por medio de los cuales estos tóxicos incrementan su polaridad facilitando su solubilidad en agua y su eliminación. A continuación se describen las principales que hemos utilizado en nuestro estudio.

### 1.8.1 GLUTATIÓN TRASFERASAS (GST).

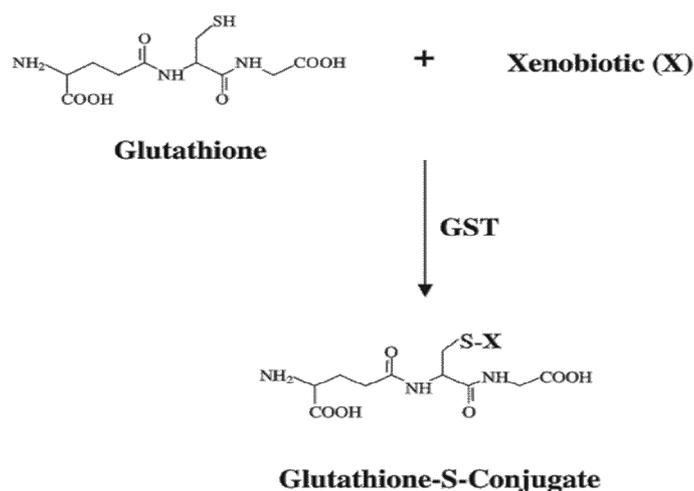
Citadas anteriormente como enzimas de Fase I, su función es transferir el Glutatión a compuesto electrófilos fuertes mediante el desplazamiento o la adición a dichos compuestos.

Existen varias isoformas de la enzima GST que se encuentran localizadas principalmente en el citosol, aunque algunas se hallan en las mitocondrias. Las diversas isoformas se agrupan en cuatro clases:  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$   $\psi$   $\theta$ ; y corresponden a cinco genes diferentes encargados de codificar estas enzimas.

Cada subunidad tiene actividad catalítica que es independiente de las otras subunidades, si bien los monómeros en estado disociado carecen de actividad alguna. Cada una de las isoformas de las glutatión-trasferasas es activa para un espectro diferente de sustancias electrófilas. Las más estudiadas por sus implicaciones funcionales son:

- **Isoenzimas de Clase  $\mu$ :** codifica para las enzimas GSTM. En concreto del gen que está localizado en el cromosoma 1p13.3, genera la isoenzima *GSTM1* implicada en la detoxificación de varios compuestos carcinógenos, incluyendo el epóxido carcinógeno derivado del tabaco benzo[a]pireno-diol-epóxido y también otras toxinas como la aflatoxin-2,3-epóxido y ciertos sulfatos reactivos (Hayes JD, et al. 2005).

- **Isoenzimas de Clase  $\pi$ :** Para estas isoenzimas se han identificado dos genes, localizados en el cromosoma 22 (q11.2), *GSTT1* y *GSTT2* (Rebbeck TR, et al. 1999). Los principales sustratos de proteína GSTT1 son diclorometano, óxido de etileno, 1,3-butadieno y etano, sustancias provenientes del humo del cigarrillo (Landi S, 2000).



**Fig. 15.** Reacción general en la que las GST participan, añadiendo un grupo Glutatión al Xenobiótico a eliminar.

Fuente: (Towsend D, et al. 2003)

La función principal de las GST es desintoxicar xenobióticos electrófilos (contaminantes, carcinógenos y mutágenos), catalizando el ataque nucleofílico del GSH en la zona electrofílica del xenobiótico (**Fig. 15**). Esta zona puede ser un carbono electrófilo, azufre, o átomos de nitrógeno de dichos sustratos xenobióticos no polares. Evitan de este modo la reacción de estos xenobióticos electrófilos con zonas nucleofílicas de proteínas celulares esenciales y/o ácidos nucleicos (Josephy PD, 2010; Hayes JD, et al. 2005). En concreto, la función de GST es doble (Eaton DL, et al. 1999):

- 1) Unirse al sustrato por su zona hidrófoba, así permiten que el GSH se una al sitio hidrófilo adyacente; en conjunto forman el sitio activo de la enzima.
- 2) Posteriormente, activar el grupo tiol de GSH; lo que permite el ataque nucleófilo sobre el sustrato.

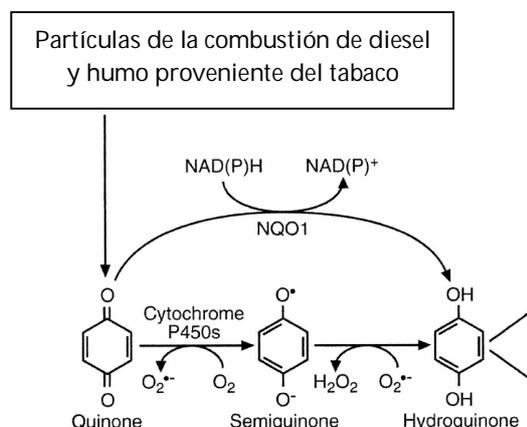
Se consigue así desactivar/desintoxicar compuestos que puedan dañar macromoléculas celulares ADN, proteínas y lípidos. También, juega un papel en la protección de tejidos contra especies reactivas de oxígeno (ROS) e hidroperóxidos lipídicos generados en situaciones de estrés oxidativo (Dickinson BC, et al. 2011).

Los compuestos específicos que las GSTs son capaces de metabolizar abarcan una amplia gama de toxinas del medio ambiente, agentes quimioterapéuticos, pesticidas, herbicidas, agentes carcinógenos y epóxidos derivados del metabolismo de otras sustancias como el proveniente del tabaco. Las reacciones de desintoxicación de estos compuestos comprenden los cuatro primeros pasos de la síntesis de ácido Mercaptúrico (Hayes JD, et al. 2005), con la conjugación a GSH que sirve para hacer que los sustratos sean más solubles, lo que les permite ser retirados de la célula por transportadores específicos. Después de la exportación, los productos de conjugación son excretados por la bilis convertidos en Cisteína y ácido Mercaptúrico en el intestino y el riñón. El resultado es generalmente una sustancia menos reactiva y más hidrófila, en consecuencia un conjugado soluble que puede eliminarse fácilmente (Josephy PD, 2010).

Otras funciones destacables de las GSTs es su capacidad de unión a ligandos no sustratos, que juegan importantes implicaciones de señalización celular. Varias isoenzimas GST de diversas clases han demostrado capacidad para inhibir la función de una quinasa implicada en la ruta MAPK-Quinasa que regula la proliferación celular y la muerte, por tanto inhiben la cascada de señalización (Laborde E, 2010). En concreto es la isoforma GSTP1, una isoenzima bien caracterizada de la familia GST. Se ha observado sobreexpresión en una mayoría de las líneas celulares tumorales humanas y de prevalencia en los tumores resistentes a quimioterapia. Por tanto hay una creciente evidencia que apoya el papel de la GSTs en el desarrollo del cáncer y la resistencia a fármacos quimioterapéuticos. El vínculo entre GSTs y el cáncer es más evidente por sobreexpresión de GSTP1 en muchos tipos de cáncer, pero también es apoyado por el hecho de que el fenotipo transformado de las células tumorales, se asocia con las vías de señalización reguladas con funciones quinasa aberrantes. La mayoría de fármacos contra el cáncer son sustratos pobres para GSTP, lo cual indica que el papel de GSTP en muchas líneas de células tumorales no es para desintoxicar los compuestos. Esta teoría también se le da credibilidad por el hallazgo común de sobreexpresión de GSTP en líneas de células tumorales que no son resistentes a los fármacos (Tew KD, et al. 2011). Aunque la actividad funcional de las GST es la detoxificación de xenobióticos en ocasiones provocan la producción de metabolitos activos capaces de reaccionar con el ADN e iniciar la carcinogénesis.

#### 1.8.2 QUINONA OXIDOREDUCTASA 1 (NQO1).

Es una flavoproteína citosólica reductasa implicada en la activación/detoxificación de quinonas (como la mitomicina C) y de compuestos activos similares, incluyendo los metabolitos del benceno (hidrobenzoquinona o benzoquinona). NQO1 realiza la reducción mediante transferencia de 2 electrones por medio de 2 hidruros (H<sup>+</sup>) utilizando indistintamente NADPH o NADH como donador **(Fig. 16)**



**Fig. 16.** Mecanismo de NQO1 de eliminación de ROS mediante reducción de quinonas a hidroquinonas más soluble.

Fuente: (David GL, et al. 2003).

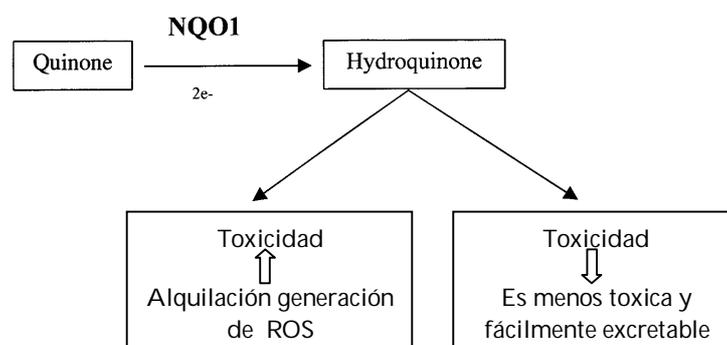
NQO1 varía sus niveles de expresión y actividad de unos tejidos a otros, es una enzima intracelular, localizada principalmente en el citosol, aunque una pequeña fracción se encuentra asociada a microsomas, mitocondrias, membrana plasmática y núcleo. La fracción de NQO1 asociada a membranas se incrementa ante situaciones de estrés oxidativo, lo cual podría potenciar la protección antioxidante de estas estructuras. Su principal función es la de convertir Quinonas derivadas del benceno (Lind C, et al. 1990), compuestos relacionados con hemotoxicidad, en derivados menos tóxicos como las hidroquinonas a la vez que reduce ROS.

La enzima NQO1 desempeña funciones tanto antioxidantes como pro-oxidantes, además de participar en el mantenimiento del estado redox intracelular.

- Papel antioxidante: Diversos estudios asignan un papel a NQO1 como antioxidante a través de la reducción de quinonas endógenas. Estas en su estado reducido, protegen del daño oxidativo. Concretamente en liposomas y hepatocitos, catalizan la reducción de diversos análogos del Coenzima Q (CoQ) para la consecuente generación de ubiquinol, que no es más que CoQ en forma reducida, un potente antioxidante. Por tanto, NQO1 juega un papel importante en la respuesta celular frente al estrés oxidativo (Gutierrez PL, 2000).

Debido a su participación en la regulación del balance redox intracelular y en el funcionamiento de rutas de transducción de señales, se ha prestado un gran interés a la participación de *NQO1* en la carcinogénesis como enzima preventiva contra el cáncer en el control del crecimiento celular. La falta de actividad de *NQO1*, está asociada con la carcinogénesis, como ocurre en algunas células de cáncer de mama, donde constituye un factor de pronóstico negativo. Esto es debido al uso en los tratamientos de cáncer de mama con moléculas de estructura quinona o benzoquinona como son 2,5-diaziridinyl-3,6-dimethyl-1,4-benzoquinone y Mitomicina C, cuya activación última es llevada a cabo en el organismo por las enzimas quinonas reductasas como lo es *NQO1* (Beall HD, et al. 1995). Estas moléculas son inicialmente dosificadas como profármacos que han de activarse en nuestro organismo mediante metabolismo reductivo de estas enzimas, por lo que en individuos con una con el polimorfismo genético que disminuya o anule su actividad, estas moléculas no se activarán y no ejercerán su acción antitumoral correctamente.

A su vez, el papel como enzima reductora resulta una paradoja en su relación con la carcinogénesis, ya que en algunos casos el metabolismo por *NQO1* produce un producto más activo como son las hidroquinonas redox-lábiles que pueden reaccionar con oxígeno molecular para formar semiquinonas y generar especies reactivas de oxígeno (Ross D, et al. 2000). Además de que puede causar aumento del estrés oxidativo a través de este mecanismo, la reducción de la fracción de quinona puede producir un compuesto que es capaz de realizar reacciones de alquilación de sitios nucleófilos, incluyendo ADN (**Fig. 17**).



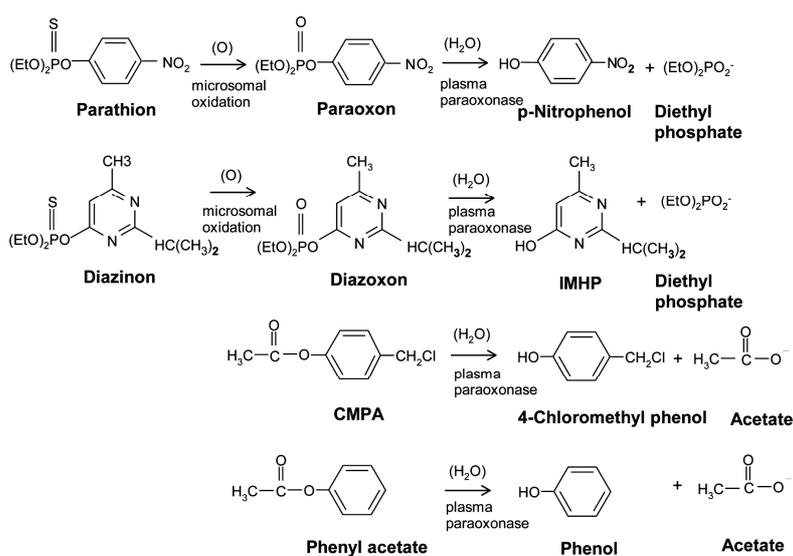
**Fig. 17** .Mecanismo de acción de *NQO1*.

Fuente: Modificado de (Ross D, et al. 2000)

### 1.8.3 PARAOXONASA 1 (PON1):

Conocida inicialmente con este nombre por su capacidad de hidrolizar compuestos organofosforados (ésteres del ácido fosfórico).

Los sustratos de PON1 son tri-ésteres del ácido fosfórico como paraoxón y diazoxón (Chambers JE, 2008), así como metabolitos de los insecticidas altamente tóxicos de estos mismos (**Fig. 18**). Esta enzima hidroliza también los agentes nerviosos sarín y somán, además de ésteres aromáticos como fenilacetato y naftilacetato. Es una enzima asociada a lipoproteína de alta densidad (HDL) con función antioxidante, implicada en la hidrólisis del metabolito oxigenado (oxón) a nivel hepático y sérico.



**Fig 18.** Diferentes vías de metabolización de insecticidas organofosforados

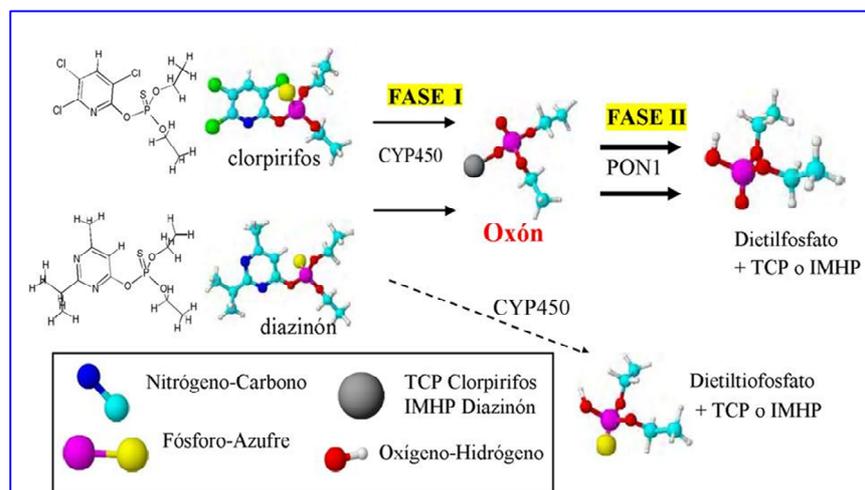
Fuente: (Chambers JE, 2008)

Las funciones de este enzima son numerosas:

- Como integrante de la lipoproteína de alta densidad, se le atribuye un importante papel protector contra la aterosclerosis por prevenir la oxidación de lipoproteínas, en concreto por su capacidad de hidrolizar Homocisteína Tiolactona (Serrato M, et al. 1995). En principio se pensó que la enzima podría ser capaz de impedir o limitar la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Posteriormente se demostró que PON1 posee actividad de homocisteína tiolactonasa (HcyT) capaz de hidrolizar lactonas y esteres de carbonatos cíclicos (Billecke S, et al. 2000). Hidroliza HcyT para formar nuevamente Homocisteína en una reacción  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente. Estos descubrimientos sugirieron que la función anti-aterogénica de PON1 no se restringe solamente a la inhibición de la oxidación de las LDL.

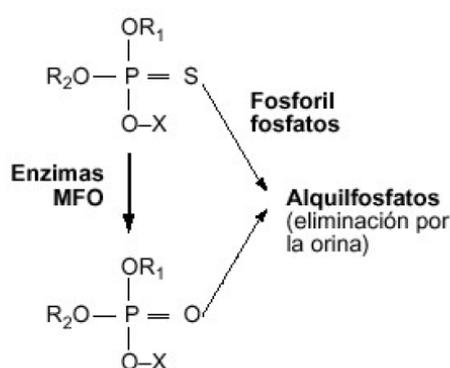
- La Paraoxonasa 1 (PON1) también presenta propiedades antioxidantes a nivel sistémicas contra posibles desajustes del estrés oxidativo, debido a su capacidad de hidrolizar varios plaguicidas organofosforados utilizados en la industria agroalimentaria (Costa LG, et al. 2005). Esta función es muy importante, aun más si cabe, si tenemos en cuenta la evidencia científica existente que asocia el desarrollo de tumores con la exposición a insecticidas. El mecanismo de detoxificación de estos compuestos insecticidas tan usados en la industria agrícola, es llevado a cabo través de una vía de dos etapas. Implica inicialmente la bioactivación inicial del compuesto original por los sistemas del citocromo P450 y a continuación, la hidrólisis del metabolito resultante oxigenado (Oxón) por Paraoxonasas sérica y hepáticas (Khuder SA, et al. 1998) (**Fig. 19**).



**Fig.19.** Mecanismo de acción conjunto de CYP450 y PON1 para la detoxificación de diferentes moléculas insecticidas tóxicos.

Fuente: Modificado de (Khuder SA, et al. 1998)

En términos generales, entre el 75 y el 100 % de los organofosforados administrados por vía oral se transforma en compuestos solubles, en la **fig. 20** se esquematiza el proceso de eliminación de los compuestos de estructura general de esteres del ácido fosfórico, llevado a cabo por enzimas de función mixta, originando compuestos mas solubles para su posterior eliminación urinaria o también por heces, por un periodo que oscila entre las 24 y 48 horas tras la administración o ingestión accidental (Obiols Quinto J, 1998).



**Fig. 20.** Esquema elemental del metabolismo de los organofosforados, papel de las Oxidasas de función mixta (PON1) y su transformación final en alquilfosfatos.

Fuente: modificado (Georgakilas AG, et al. 2009).

En definitiva, la exposición crónica humana a pesticidas órgano fosforados que afecta a personal trabajador agrícola que usa insecticidas o bien trabajan en su manufactura, puede provocar saturación de los sistemas de eliminación (Georgakilas AG, et al. 2009), y desencadenar un aumento del estado del estrés oxidativo que puede afectar directamente la integridad genómica del ADN mediante diferentes procesos que implican modificaciones del material genético (Shadnia S, et al. 2005). Entre ellos se encuentran la oxidación de bases nitrogenada en residuos guanina a 7-hidro-8-oxo deoxignanosina (8 oxo-Gu), o la formación de aductos voluminosos principalmente a través de ataque al ADN por la acción directa de los pesticidas carcinógenos químicos o por los radicales libres ROS. Puede provocar rupturas de las hebras del ADN (Shen HM, et al. 1999), la inducción de entrecruzamientos de la cromatina (Jena NR, 2012).

Todo ello provoca desregulación del control del ciclo celular, fallo en los mecanismos de reparación, imposibilidad de apoptosis y el desarrollo de una predisposición al desarrollo de cáncer.

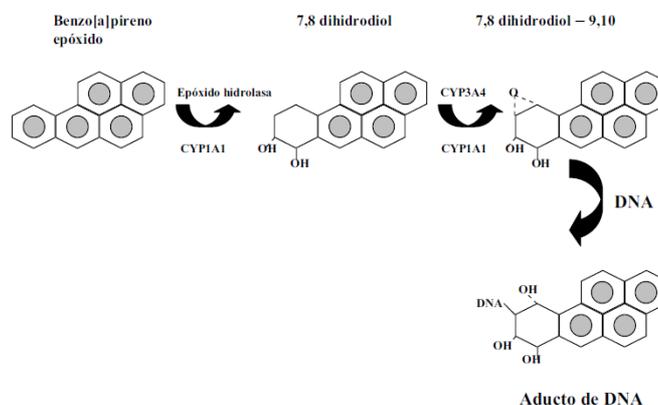
#### 1.8.4 EPÓXIDO HIDROLASA MICROSOMAL 1 (EPHX1 Ó MEH1):

Enzima que juega un papel importante tanto en la activación y/o detoxificación de compuestos aromáticos policíclicos, como son los carcinógenos epóxidos derivados del tabaco. Las enzimas epóxido hidrolasas engloban un grupo de enzimas que se caracterizan por añadir agua a los epóxidos y dar lugar a los correspondientes diol y trans-dihidrodiol. Se agrupan en cinco clases:

- Solubles o citosólicas
- Microsomales, que se localizan en el retículo endoplásmico de las mitocondrias.
- Leucotrienos A4 hidrolasa.
- Colesterol epóxido hidrolasa.
- Hepoxilina hidrolasa.

Es la enzima microsomal, que en combinación con la citosólica actúa disminuyendo el efecto del estrés oxidativo causado por diversos agentes endógenos, pero su especial interés en la carcinogénesis deriva de su participación en la detoxificación de agentes genotóxicos cancerígenos. EPHX1 es una enzima estudiada por su posible implicación en la carcinogénesis, ya que es una enzima crítica en el metabolismo de xenobióticos (AETOX, 1996), juega un papel importante tanto en la activación como en la desintoxicación de los HAP y aminas aromáticas. EPHX1 cataliza la hidrólisis de arenos, alquenos, y epóxidos alifáticos de HAP y aminas aromáticas. Por tanto, es responsable de la hidrólisis de epóxidos, que son uno de los carcinógenos mejor conocidos. Cabe destacar entre ellos el Benzo (a) pireno y el benzo(a) nantraceno, encontrados en el humo del tabaco. Normalmente la conversión de los epóxidos es frecuentemente una reacción de inactivación; pero los metabolitos trans-dihidrodiol pueden sufrir posteriores activaciones por los citocromos P450 y dar lugar a

intermediarios electrofílicos que pueden unirse de forma covalente al ADN como aductos e iniciar el proceso tumoral. (Fig. 21)



**Fig. 21.** Efectos tóxicos del tabaco en su metabolización por EPHX y Citocromo P-450.  
Fuente: (AETOX, 1996).

Además intervienen en la detoxificación de otras sustancias carcinogénicas como el estireno y también en el metabolismo del 1,3 dicloro-2-propanol y el 3-cloro-1-2-epoxiporpano, ambos usados en la industria como barnices acuarelas, lacas, etc. Sin embargo, EPHX1 juega un doble papel en la desintoxicación y activación de procarcinógenos, y su papel en la carcinogénesis puede depender de la exposición a diferentes sustratos del medio ambiente (Liu F, et al. 2012). Por tanto en cierto sentido, EPHX1 es un protector como enzima implicada en las defensas oxidativas generales contra un número de sustancias ambientales y sus polimorfismos genéticos.

## 1.9 MECANISMOS DE REPARACIÓN Y SÍNTESIS DEL ADN

El organismo posee diversas herramientas para contrarrestar los daños al ADN. Por un lado la maquinaria enzimática que metabolizan aquellos compuestos genotóxicos y por otro mecanismos de reparación del ADN una vez que el daño ya ha ocurrido. Este último mecanismo implica un conjunto de enzimas y procesos conocidos como mecanismos de reparación del ADN (Lindahl T, 1994).

Los procesos de reparación del ADN existen tanto en organismos procariotas como eucariotas, y muchas de las proteínas involucradas se han conservado durante la evolución. Puesto que el ADN es una molécula que desempeña un papel activo y crítico en la división celular, el control de la reparación del ADN está estrechamente ligado a la regulación del ciclo celular (Branzei D, et al. 2008).

Las células cumplen su ciclo celular correctamente si los daños en el ADN no corrompen la integridad y accesibilidad de información esencial en el genoma. La evolución ha generado una variedad de estrategias de reparación que restauran la información perdida. Si es posible, las células utilizan la cadena de ADN complementaria, si está no ha sido modificada; o la cromátida hermana como "plantilla" para restaurar la información original (Lindford NJ, et al. 2006; Gensler HL, et al. 1981). Los mecanismos de reparación se clasifican en cuatro categorías generales en función del tipo de reacción química básica que interviene en la corrección:

1.9.1 Reparación directa.

1.9.2 Reparación por escisión de Bases (BER)

1.9.3 Reparación por escisión de nucleótidos (NER)

1.9.4 Reparación de Desapareamiento de Bases (Mismatch Repair o MMR)

1.9.5 Reparación sobre la marcha.

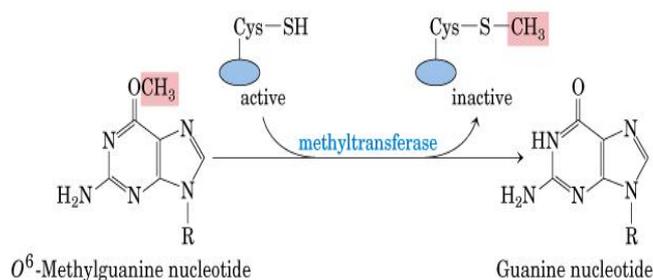
1.9.1 REPARACIÓN DIRECTA:

Este tipo de reparación no requiere eliminación de nucleótidos o bases nitrogenadas, por tanto es aquella en la que se revierte la lesión empleando enzimas para reparar directamente alteraciones nucleotídicas. Los principales enzimas empleados son la fotoliasa y la metiltransferasa (Rao KS, Et al. 1992).

-La fotoliasa se encarga de la reparación de dímero de timina producidos por luz ultravioleta entre los 200-300 nm (Thompson CL, et al. 2002).

- La metil-transferasa repara los daños causado a la Guanina, en concreto la metilación de guanina. La guanina metilada (O<sup>6</sup> metil guanina) es citotóxica, mutagénica y tumorigénica. Es una reparación directa, mediante la

transferencia del alquilo grupo de las bases del ADN, para un residuo de cisteína específico interno que se encuentra en la secuencia de aminoácidos de la enzima (Mitra S, et al. 1993). La **fig. 22** representa la aparición de guanina metilada y el mecanismo por el cual se repara este error.



**Fig. 22.** Reacción de reparación de la Guanina metilada.

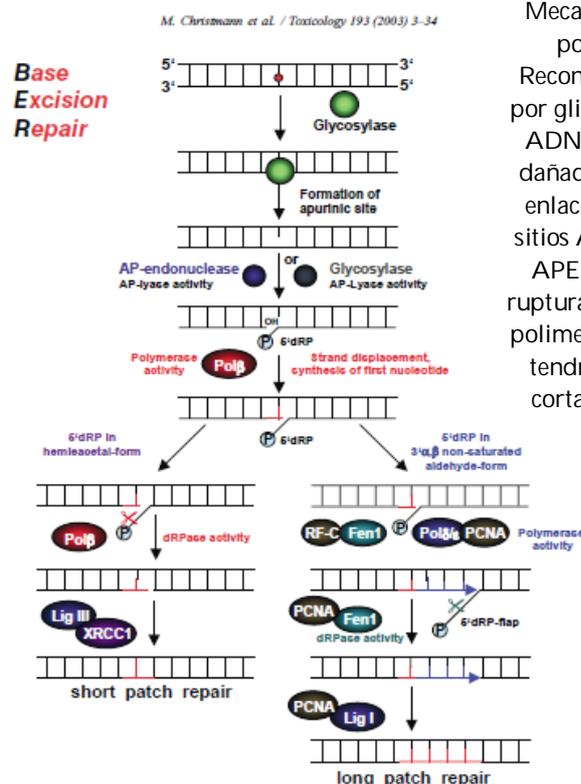
Fuente: (Margison GP, et al. 2002)

#### 1.9.2 REPARACIÓN POR ESCISSION DE BASE (BER):

BER (=Base Excision Repair). Es el más versátil de los mecanismos de reparación. Las lesiones principales que reconocen estas enzimas son oxidación de bases de ADN que surgen espontáneamente por replicación o durante respuesta inflamatoria, o por la exposición a agentes exógenos, incluyendo la radiación ionizante y la luz de onda larga UV. Otra fuente principal de lesiones que son reparadas por BER es la alquilación del ADN inducido por alquilantes endógenos, especies exógenas y carcinógenas como nitrosaminas. Normalmente son modificaciones que al afectar a enlaces de hidrógeno entre las bases, induce inestabilidad de la doble cadena dando como resultado un incorrecto emparejamiento de bases. También corrigen errores por desaminación de bases, como xantina ocasionada por desaminación de Guanina.

El mecanismo de corrección retira el nucleótido equivocado en dos etapas: reconocimiento y posterior eliminación. BER requiere una serie de enzimas en la reacción básica para llevar a cabo la reparación de ADN. Estos incluyen un DNA glicosilasa, una endonucleasaapurínica o apirimidínica (endonucleasa AP), una polimerasa de ADN, y una ADN ligasa (Mitra S, et al. 1997). El mecanismo consta de una serie de pasos o etapas que se resumen (**Fig. 23**):

- **Reconocimiento de la base y posterior eliminación:** El primer paso se lleva a cabo por glicosilasas específicas de ADN que reconocen y eliminan la base dañada o incorrecta hidrolizando los enlaces N-glicosídico (Scharer OD, et al. 2001), de tal manera que liberan una base libre dejando un sitio abásico (sin base)apurínico/apirimidínico (AP) en el ADN. Tales sitios AP son citotóxicos y mutagénicos, por lo que se debe actuar sobre ellos.
- **La reconstrucción** in vitro de la vía de reparación BER, ha establecido los requerimientos mínimos de la reparación. Esta puede llevarse a cabo a través de dos vías alternativas: rotura de la cadena que puede repararse mediante mecanismos de “parche corto o short patch repair” (Dianov G, et al. 1992), donde es reemplazado un solo nucleótido; o bien mediante “parche largo o long patch repair” (Levin DS, et al. 2000), donde serán reemplazados de 2 a 10 nucleótidos (Liu Y, et al. 2007).



Mecanismos de reparación por escisión de bases Reconocimiento de la lesión por glicosilasas específicas de ADN que eliminan la zona dañada por hidrólisis de los enlaces N-glicosídicos. Los sitios AP son procesados por APE. Dependiendo de las rupturas por las 5-dRP por las polimerasas la reconstrucción tendrá lugar mediante vía corta o bien por vía larga.

**Fig. 23.** Mecanismos de reparación por escisión de bases.

Fuente:(Christmann M, et al. 2003)

La elección entre la reparación entre una vía u otra es materia de investigación. Varios factores influyen en la decisión: el tipo de lesión, el estado del ciclo celular y el momento de división celular (Matsumoto Y, et al. 1995; Levin DS, et al. 2000).

### 1.9.3 REPARACIÓN POR ESCISIÓN DE NUCLEÓTIDO (NER).

NER (=Nucleotide Excision Repair). Mediante este mecanismo se reparan daños que afectan a regiones más largas; de entre dos a treinta bases, de forma que se el fragmento dañado es reemplazado por un oligonucleótido, utilizando la banda intacta como molde. NER es el mecanismo más complejo de los procesos de reparación/escisión; implica al menos 30 proteínas diferentes (Friedbreg EC, 2001). Presenta una amplia especificidad, siendo capaz de reconocer una gran variedad de alteraciones químicas que resultan de distorsiones locales de la estructura. NER es el único sistema de reparación de aductos voluminosos del ADN, como los fotoproductos diméricos de ligamientos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PPs) inducidos por la luz UV, o los formados por benzo[a]pireno, entre otros (Hanawalt PC, 2001).

Se ha observado que los individuos con deficiencias en los procesos de reparación NER están afectados por una serie de complejos desórdenes caracterizados por una hipersensibilidad a la luz ultravioleta (Vermulen W, et al. 1997). Uno de ellos es la enfermedad conocida como *Xeroderma Pigmentosum* (XP) (Berneburg M, et al. 2001), un trastorno genético con gran propensión al desarrollo de cáncer. Ello sugirió que NER podría ser un mecanismo efectivo de protección contra el cáncer, y que los genes reparadores del ADN podrían catalogarse como genes supresores de tumores. Estudios posteriores demostraron que un mecanismo NER defectuoso también está asociado a otras dos raras enfermedades no asociadas al cáncer, como el *Síndrome de Cockayne* y la *Tricodistrofia*.

NER está dividido en dos vías diferentes denominadas: **Reparación Genómica Global** (GGR) y **Transcripción de Acoplamiento de Reparación** (TCR) (Hanawalt PC, 2001). La principal diferencia entre ambas es que GGR, es en gran medida independiente de la transcripción, elimina las lesiones de los dominios no transcritos

del genoma y de la hebra no transcrita de regiones transcritas; mientras que TCR es un mecanismo acoplado a los procesos de replicación (Mullenders LH, et al. 2001).

Los pasos enzimáticos del NER (**Fig. 24**) incluyen:

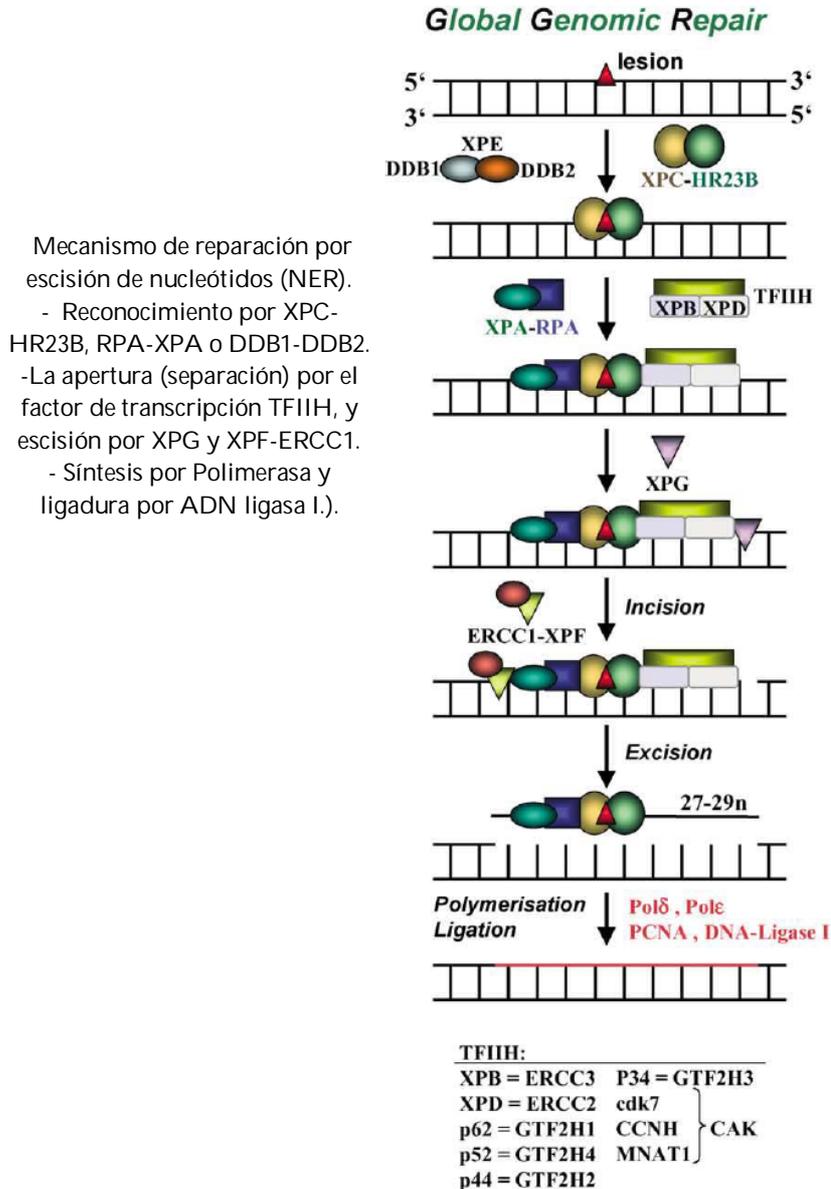
- **Reconocimiento de la lesión:** El paso inicial es el reconocimiento del ADN dañado, que puede ser realizado por dos proteínas: XPC–HR23B y RPA–XPA. Ambos procesos reconocen la lesión y a través de un dominio en forma de dedo de Zinc se acopla al segmento oligonucleótido afectado, y reclutan otras proteínas; cuya asociación incrementará la afinidad de XPA al DNA dañado (Sancar A, 1996).

- **Apertura del DNA:** Tras el reconocimiento de la lesión, el complejo XPA-RPA recluta al sitio de la lesión el multicomponente factor basal de transcripción TFIIH (Schaeffer L, et al. 1993; Yokoi M, et al. 2000). Este complejo contiene a las proteínas XPB y XPD que son helicasas pero con polaridad opuesta, con lo que abren o desenrollan la doble hélice a uno y otro extremo de la región del ADN dañado (Evans E, et al. 1997).

- **Escisión del ADN dañado:** Tras el reconocimiento del daño y la formación del complejo THIF, es necesario llevar a cabo la escisión del ADN por ambos flancos de la lesión. Esto es llevado a cabo por la proteína XPG (ERCC5) por el extremo 3' y el complejo ERCC1 por el extremo 5', al que se unen unas nucleasas que al activarse cortan los extremos flanqueantes (Evans E, et al. 1997). El oligonucleótido que contiene el sitio dañado y que aun está unido a algunos de los componentes del sistema de escisión es desplazado dejando una mella en una de las bandas del ADN.

- **Síntesis y Reparación:** Una vez que se han completado los acontecimientos de escisión (reconocimiento, apertura por helicasas y escisión por escinucleasas), el siguiente paso se efectúa mediante síntesis reparadora mediante DNA polimerasa delta/épsilon junto con factores accesorios de replicación representados por el antígeno nuclear PCNA y el factor de replicación RFC (Aboussekhera A, et al. 1995). El nuevo segmento complementario se liga por ambos extremos gracias a una ligasa de ADN (DNA ligasa I).

## Nucleotide Excision Repair



**Fig. 24.** Mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER).

Fuente: (Christmann M, et al. 2003)

Las proteínas implicadas en los procesos de reparación NER son muy numerosas. A continuación describiremos la función de dos de enzimas que han sido estudiadas por su posible implicación en neoplasias por fallos en su funcionamiento:

- **Xeroderma Pigmentosum grupo A (XPA):**

Enzima esencial para el reconocimiento de la zona dañada, establece unión con otras proteínas del sistema de reparación NER que conforman el complejo de reconocimiento de la zona dañada.

Su denominación proviene de la enfermedad que ocasiona su déficit: Xeroderma Pigmentosum; enfermedad que se caracteriza por una sensibilidad extrema a la luz solar, ocasionando cambios de pigmentación, quemaduras solares en la piel y provoca una incidencia muy elevada de cáncer de piel. Alrededor del 60% de los individuos afectados muestran una respuesta de quemadura solar exagerada y prolongada. En una minoría de los casos hay alteraciones neurológicas de gravedad variable (Saijo M, et al. 2011).

XPA es una enzima que forma parte del complejo de reparación NER, es una proteína de 32 kDa de PM, formada por 273 aminoácidos. Forma parte del complejo abierto de reconocimiento, se une a las proteínas RPA, ERCC1, DDB2, y TFIIH. Su función es esencial para el inicio del mecanismo de reparación de nucleótido (NER). Ya que realiza el reconocimiento de la lesión, en concreto XPA, es una proteína con dominios "zinc-finger DNA binding protein" (Koberle B, et al. 2006), es decir, una proteína con dominios de dedos de Zinc para su unión al sitios específicos del ADN. Juega un papel muy importante tanto en la transcripción como en los procesos de corrección inherentes al mecanismo de reparación NER.

La proteína XPA se une a las áreas del ADN dañado, mediante este dominio de dedos de Zinc, donde interactúa con muchas otras proteínas del proceso NER (Tanaka K, et al. 1990). Posteriormente esta unión provoca el reclutamiento de XPC y del factor de transcripción II-H (TFIIH), formando un complejo estable y específico, previo al momento de la incisión (Wakasugi M, et al. 1999).

Por tanto, XPA está implicada en la verificación del reconocimiento de la zona dañada y ayuda al posicionamiento de las endonucleasas (XPG y XPF-ERCC1) que realizarán la escisión de la zona dañada (Ding D, et al. 2012). Es indispensable la

presencia de esta proteína para iniciar el proceso (Sugasawa K, et al. 1998; Volker M, et al. 2001). Las proteínas de este complejo desenrollan la sección de ADN dañado, sustituyen la parte dañada con el ADN correcto, y finalmente se ligan las zonas necesarias para el restablecimiento de la doble cadena. (Fig. 25)

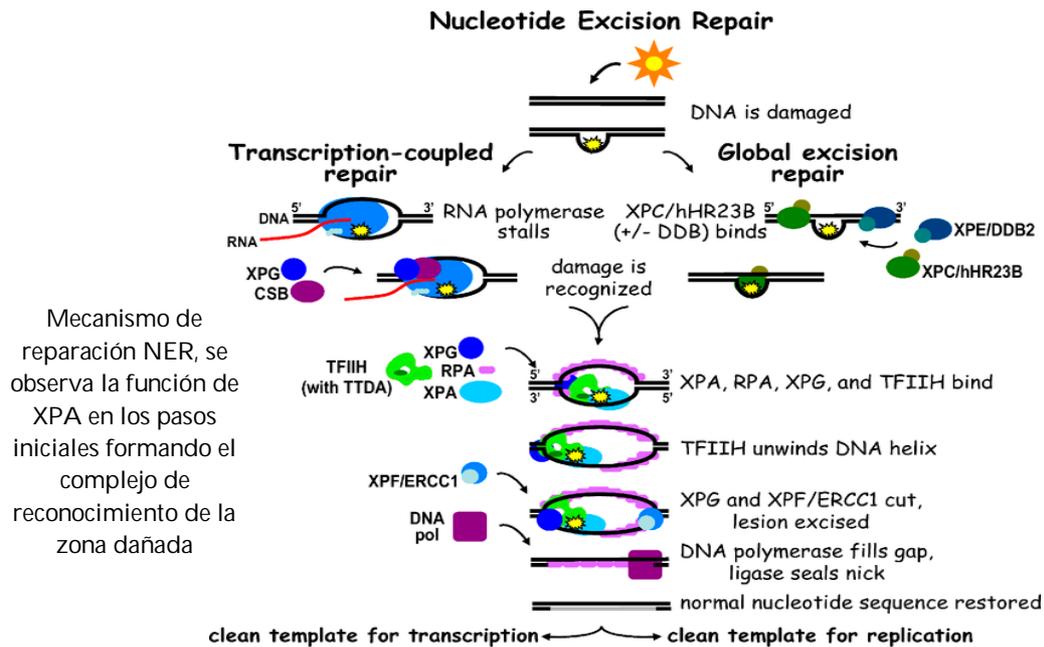


Fig. 25. Mecanismos de reparación NER.

Fuente: (Sarasin A, 2008)

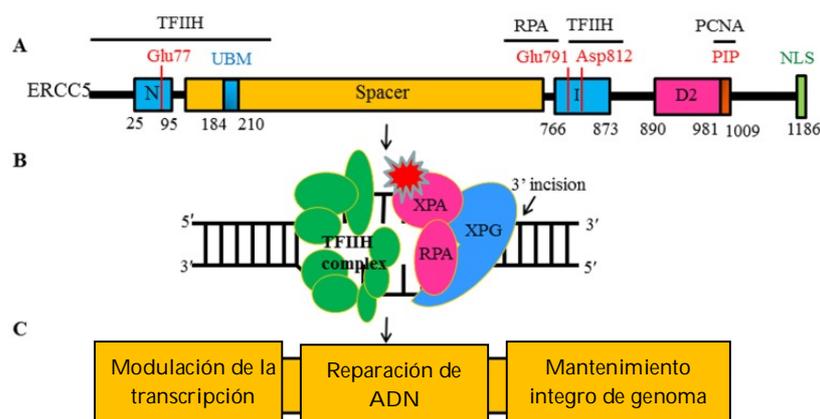
- **Excision repair cross-complementing 5 (ERRC5)**

Es una proteína implicada en el mecanismo de reparación NER. En concreto ERRC5 también es conocida como proteína XP tipo G (XPG), que es una proteína indispensable en el proceso de reparación NER.

Es una proteína de 1186 aa con actividad endonucleasa de ADN específica de la familia de endonucleasas 1 (FEN1) (Gowda S, et al 2007). Posee preferencia por ADN dañado y es responsable de la incisión 3' que se realiza durante la reparación NER, en concreto actúa tras la formación del complejo THFII, recordemos que este complejo es reclutado en el proceso inicial por la proteína XPA (anteriormente explicada). En el sitio de la lesión, esta proteína conjuntamente con otras del mecanismo NER crean una estructura de "burbuja" de ADN sobre una longitud de aproximadamente 25

nucleótidos (**Fig. 26**). La proteína XPG realiza una incisión produciendo un corte endonucleolítico en la cadena de ADN dañada a una distancia de 0-2 nucleótidos en el extremo 3'. Posteriormente se elimina el fragmento dañado y una polimerasa repondrá el fragmento que falta.

En la mayoría de los estudios se ha demostrado que la incisión en 3' hecha por la proteína XPG parece estar hecha antes y de forma independiente de la incisión 5', que está realizada por XPF-ERCC1. Esta proteína además también está implicada en la estabilización de un complejo de pre-incisión en el ADN dañado (Rouissi K, et al. 2011). La proteína también posee algunas funciones en otros procesos celulares, incluyendo procesos reparación acoplada a la transcripción (Schaeffer OD, 2008; Ito S, et al. 2007).



**Fig. 26.** Participación de la enzima XPG (ERRC5) en el corte de la zona dañada en el extremo 3' mediante su función endonucleasa.

Fuente: Modificado de (Devlin T, 2000)

#### 1.9.4 REPARACIÓN DE DESAPAREAMIENTO DE BASES (MMR):

Corrige errores de nucleótidos mal apareados, pero no dañados. En concreto aquellos errores cometidos por la ADN polimerasa durante la replicación, que dan lugar a desapareamientos de bases o "mismatch", creando bases desapareadas (Iyer RR, et al. 2006). Puede originarse por tautomería de las bases, como el que se produce en la forma imina de citosina que se empareja con Adenina; o la forma enólica de Timina que se empareja con Guanina, o bien, por desaminación de Citosinas metiladas que generan Timinas. Además, el deslizamiento de la cadena nueva sobre la cadena

molde durante la replicación también puede producir bucles de inserción/delección ocasionando inestabilidad de microsatélites cuando se afectan regiones repetitivas (Kunkel TA, et al. 2005).

En condiciones normales la actividad exonucleasa asociada a la polimerasa evita los desapareamientos, pero puede que en ocasiones no lo corrija en su proceso; si no lo hace hay que eliminarlo antes de que la banda se replique, ya que si no, la mutación quedaría fijada. Para ello debe reconocer qué hebra es la correcta. Aunque en eucariotas no se sabe cuál es el mecanismo de reconocimiento de la hebra hija, en procariontas (*E. coli*) sí se sabe que el ADN suele tener metiladas sus bases, pero tras la replicación la hebra nueva no se metila hasta comprobar que no tenga errores, por lo que la maquinaria de reparación supone que si hay un error tras la replicación, se habrá producido en la hebra nueva, la no metilada (Larrea AA, et al. 2010; Modrich P, 2006). El esquema del modelo en humanos se muestra en la figura (Fig. 27)

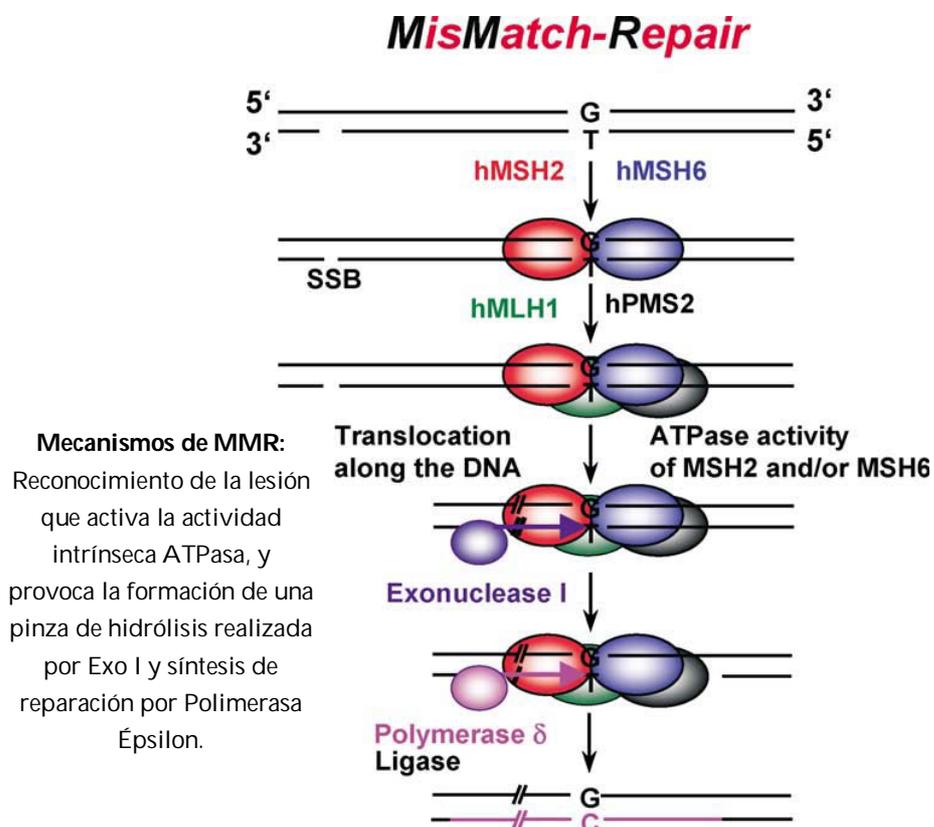


Fig. 27. Mecanismo de reparación MMR.

Fuente: (Christmann M, et al. 2003)

Estos métodos mencionados hasta ahora, reparan el ADN de forma fidedigna, recuperando el genotipo original. Pero cuando los daños son excesivos, se producen otros tipos de reparación, que son más propensos a errores, y no recuperan el genotipo original, se trata de soluciones de emergencia cuando está en juego la supervivencia celular.

#### 1.9.5 REPARACIÓN SOBRE LA MARCHA:

Este es el principal sistema de corrección de daños. Lo realizan las propias ADN-polimerasas (ADN Pol-I y ADN Pol-II) mediante su actividad 3'-5' exonucleasa. Es un mecanismo de corrección de nucleótidos erróneamente incorporados. Esta incorrección es detectada porque el emparejamiento incorrecto causa una distorsión de la doble hélice que las ADN-Polimerasas pueden detectar. Sin embargo, la reparación solo puede realizarse si aún no se han añadido más nucleótidos (Goodman MF, 2002), siendo, por tanto, un mecanismo de corrección de la replicación y como tal puede ser considerado o no como un mecanismo de reparación (Kaufmann WK, 1998).

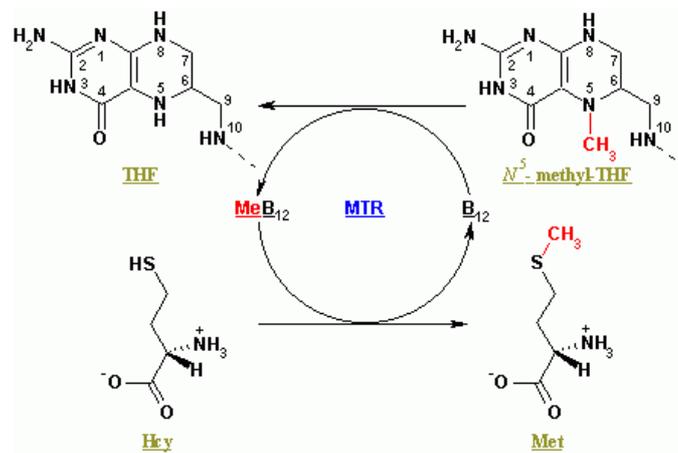
Una vez que los procesos de reparación han hecho su trabajo, comienza la síntesis de la cadena, tomando como molde la cadena homóloga. En los procesos de síntesis participan de nuevo una infinidad de enzimas, además en este proceso son necesarios determinados sustratos para llevar a cabo la síntesis. Por tanto los sustratos son un factor limitante muy importante en los procesos de síntesis.

Uno de estos sustratos es la Metionina, necesaria para procesos de metilación, actuando como grupo donador de metilos. Este sustrato es generado mediante procesos enzimáticos que implican a diversas enzimas, una de ellas es la Metionina Sintasa (MS); una enzima que indirectamente pasa a ser un factor limitante en la síntesis de ADN.

- **Metionina sintetasa (MS)**

Esta enzima cataliza la conversión del aminoácido Homocisteína (Hcy) en Metionina (Met) mediante la transferencia irreversible de un grupo metilo a partir del

5-metiltetrahidrofolato (N<sup>5</sup>-MeTHF), por tanto es responsable de la regeneración de la metionina a partir de homocisteína. Metionina sintasa cataliza la etapa final de la regeneración de Met a partir de Hcy. La reacción global transforma N<sup>5</sup>-MeTHF en Tetra-hidrofolato (THF) mediante la transferencia de un grupo metilo a la Hcy para formar Met; esta reacción depende de cobalamina (=vitamina B<sub>12</sub>) y del N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolato (que actúan como dador de metilo), por tanto ambos actúan como cofactores enzimáticos. (**Fig. 28**)



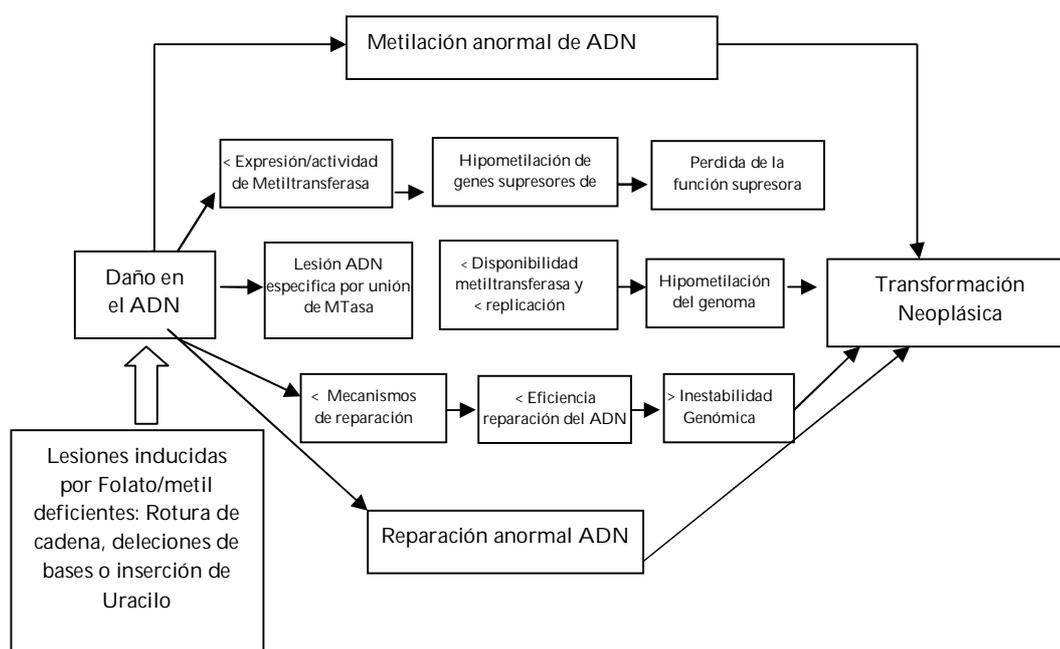
**Fig. 28.** Reacción general de producción de Metionina a partir de Homocisteína y usando Cobalamina y THF como cofactores.

Fuente: (Devlin T, 2000).

Su implicación con los mecanismos de reparación está relacionada con la necesidad de sustratos en la síntesis de ADN (Zingg JM, et al. 1997). Es conocido que Metionina es posteriormente convertido a S-adenosilmetionina (SAM) mediante una reacción dependiente de ATP; SAM se usa como donador de grupos metilo en más de 80 reacciones en el cuerpo humano, una de las más importantes es la donación de metilo en la metilación del ADN, ARN y proteínas. La Metilación del ADN es un importante mecanismo epigenético de control de la transcripción, juega un papel esencial en el mantenimiento de la función celular ya que cambios en los patrones de metilación pueden contribuir al desarrollo de cáncer. Una metilación aberrante de ADN, como procesos de hipometilación en general acompañado por hipermetilación

específica de regiones concretas, se encuentra con frecuencia en las células cancerígenas.

La hipometilación global puede generar inestabilidad cromosómica, y la hipermetilación se ha asociado con la inactivación de los genes supresores de tumores (Davis CD, et al. 2004). (**Fig. 29**)



**Fig. 29.** Hipótesis de daño al AND por metilación aberrante.

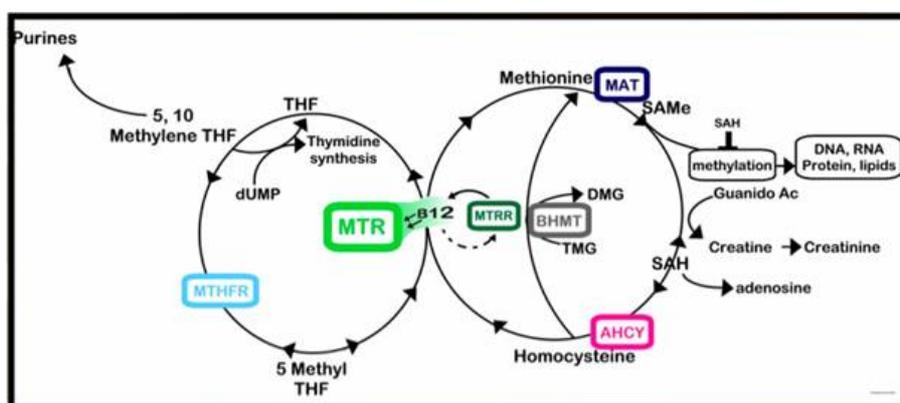
Fuente: Modificado de (James SJ, et al. 2003)

La deficiencia de micronutrientes, se ha correlacionado con un posible efecto de susceptibilidad al cáncer. Por ejemplo, el déficit de folatos, que afecta a la producción de SAM, hace que se puede ver disminuida, y por tanto ocurre la disminución de los procesos de metilación. Este déficit puede venir por falta de ingestión o por falta de absorción, como se conoce especialmente el caso de individuos alcohólicos que tiene déficit de folatos (Davis CD, et al. 2004).

Otra posible causa de déficit de sustratos para síntesis y replicación de ADN puede ser ocasionada por mal funcionamiento de la enzima MS, esta juega un papel crítico en el mantenimiento adecuado de los niveles de concentración de metionina intracelular, y por tanto de SAM. Además el THF generado participa en la reducción

del nucleótido pirimidínico desoxiuridin-monofosfato (dUMP) a desoxitimidil monofosfato (dTMP). El dUMP es el precursor del Uracilo y el dTMP es el precursor de la Timina (**Fig. 30**).

Por lo tanto la síntesis y reparación del ADN son dependientes de la concentración de metionina. Un déficit de este aminoácido puede conllevar a defectos por reducción en la reparación y síntesis del ADN, y tener implicaciones a la hora de posible desarrollo de cáncer por defectos de los mecanismos de reparación, por falta de sustratos.



**Fig. 30.** Esquema del metabolismo del folato y metionina. Implicación de diferentes enzimas en la síntesis de purinas, entre ellas MTR como enzima esencial en la síntesis de Metionina.

Fuente: (Davis CD, et al. 2004)

### 1.10 POLIMORFISMOS EN GENES DE METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS.- RIESGO DE CÁNCER

La variabilidad genética causada por polimorfismos genéticos puede afectar a una gran proporción de las enzimas de fase I y de fase II. El efecto de la variabilidad genética implica los siguientes aspectos (Shenfield, 2004):

- Una actividad enzimática normal.
- Un metabolismo ultrarrápido.
- Una actividad enzimática parcialmente deficiente.

- Un metabolismo del xenobiótico alterado cualitativamente.

A continuación, explicaremos los polimorfismos más frecuentes en las enzimas objeto de nuestro estudio, así como su posible relación con cánceres en general y más particularmente su relación con neoplasias hematológicas.

#### 1.10.1 POLIMORFISMOS DE LAS ENZIMAS GLUTATIÓN TRANSFERASAS (GST):

Los genes de dichas enzimas son muy polimórficos ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\tau$ ,  $\zeta$ ); por lo que son investigados por su posible afectación en el metabolismo de tóxicos y su relación con el desarrollo de cáncer (Bredschneider M, et al. 2002).

Existen diferencias individuales en la detoxicación de compuestos reactivos vía GSTs que son frecuentemente el resultado de la delección de sus genes. El caso más conocido es el de las isoformas GSTM ( $\mu$ ) y GSTT ( $\tau$ ). Sus genes son estudiados por la relación entre los polimorfismos y el posible desarrollo de ciertas enfermedades por déficit en su metabolismo.

La variante no modificada o silvestre del alelo (*GSTM1\*1*) corresponde a la variante más frecuente y posee actividad enzimática normal. En cambio, una variante polimórfica común del gen consiste en la delección homocigota del gen, alelo (*GSTM1\*0*) resultando en una actividad enzimática nula por déficit de expresión. Esta variante afecta aproximadamente al 50% de la población caucásica (Ketterer B, et al. 1992).

Esta pérdida génica (genotipo *null*) se debe a una delección homocigota heredada del gen y varía con la etnia y el área de estudio (Seidegard J, et al. 1988). La expresión de estos alelos delecionados parece estar diferencialmente regulada y tiene consecuencias clínicas que explican el riesgo diferencial a varias patologías, incluyendo cáncer (Strange RC, et al. 1998).

Al igual que ocurre con la subfamilia M ( $\mu$ ), el *GSTT1* también puede estar representado por dos alelos: uno funcional o alelo salvaje (*GSTT1\*1*), y el otro no funcional o alelo nulo o *null* (*GSTT1\*0*). Igualmente esta variante implica ausencia de actividad de la enzima. De nuevo, existen diferencias en el porcentaje de esta variante según la raza y la zona geográfica objeto de estudio.

Son numerosos los estudios de asociación entre diferentes enfermedades y las posibles consecuencias funcionales. La ausencia de alelos nulos (*GSTM1\*0*) y/o (*GSTT1\*0*) que presentan los individuos portadores los hacen incapaces de metabolizar correctamente varios metabolitos, entre ellos ciertos agentes con potencial carcinógeno, pudiendo presentar un riesgo incrementado al desarrollo de ciertos tipos de cánceres (Rollinson S, et al. 2000).

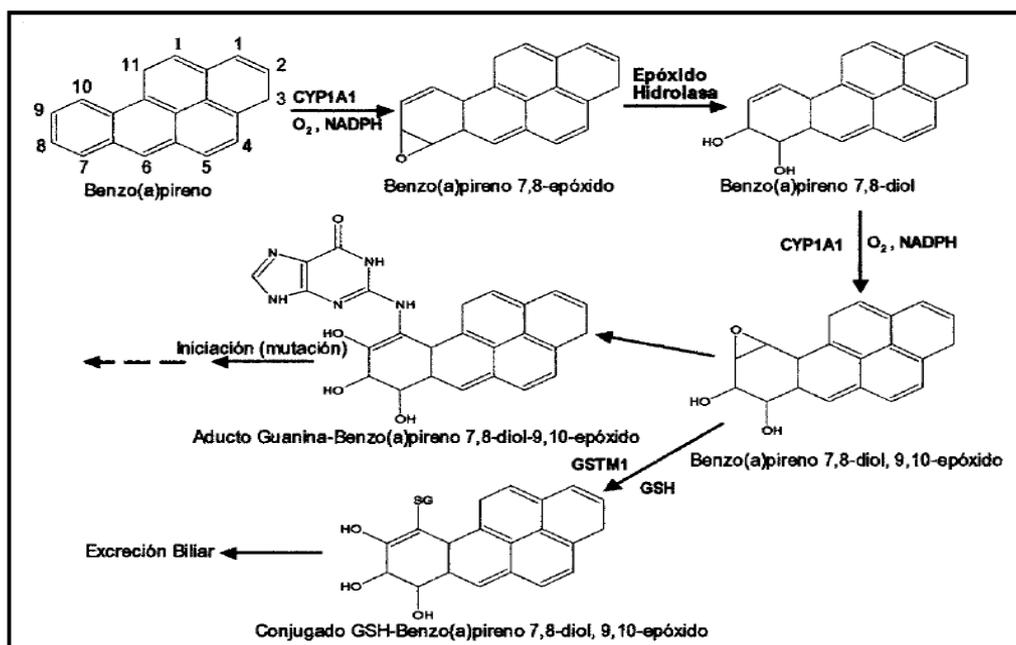
Los alelos nulos de *GSTM1* y *GSTT1* se correlacionan con un aumento de la susceptibilidad a las enfermedades asociadas con la peroxidación lipídica ocasionada por aumento del estrés oxidativo. Diversos estudios proponen que *GSTM1* y *GSTT1* son isoenzimas críticas en la desintoxicación de ROS (Aydemir B, et al. 2007). Por esta razón, una deficiencia enzimática se relacionaría con un mayor riesgo de desarrollar ciertas enfermedades asociadas con el daño oxidativo. Entre los efectos ocasionados por daño oxidativo incluimos:

- Oxidaciones de bases 8-hidroxi-guanina u 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (Kasai H, 1997).
- Daño en enzimas de sistemas reparadores (Feig DI, et al. 1993).
- Formación de aductos entre productos de peroxidación lipídica y moléculas de ADN, ocasionando cambios mutagénicos de tipo espontáneo (Pastorelli R, et al. 1998).

El efecto del genotipo *null* sobre la *GSTT1* y sus consecuencias sobre el desarrollo de posibles enfermedades es contradictorio. Esto puede ser en parte debido a la capacidad de esta enzima en situación normal (alelo *GST1\*1*) de activar algunas sustancias a compuestos aun más tóxicos que el original. Este caso lo podemos observar para el solvente diclorometano (DMC), donde la enzima con actividad normal genera, al metabolizar el DMC, un compuesto más tóxico con potencial carcinógeno en hígado y pulmón. Por tanto, la presencia del alelo mutado *GST1\*0* que ocasiona disminución o anulación de su actividad pudiera ejercer un carácter protector al anularse la función enzimática que activaría al metabolito carcinógeno (Sherratt PJ, et al. 1997).

Sin embargo, en la mayoría de las ocasiones, la disminución de la actividad conlleva consecuencias negativas. Así podemos observarlo en aquellos estudios que relacionan la implicación funcional del alelo *null* de *GSTM1* en fumadores o personas expuestas al humo del tabaco. La función normal de la enzima, ejercida por su alelo silvestre, es la desactivación de agentes carcinógenos provenientes del humo del tabaco o de procesos de combustión incompleta, como el benzo(a)pireno realizada por el CYP1A1 conjuntamente con la *GSTM1* en diferentes etapas. En la primera, se produce la formación de un epóxido, por acción de CYP1A1. Posteriormente, este epóxido es hidrolizado por la enzima epóxido hidrolasa, y finalmente, una nueva acción de CYP1A1 produce un nuevo epóxido en posición 9-10; en concreto 7,8-diol-9,10-epóxido, metabolito muy reactivo conocido como BaP. Este último, es capaz de formar aductos con el ADN al unirse covalentemente a la guanina iniciando un proceso tumoral. Esto no ocurre si es metabolizado mediante adición a glutatión catalizado por la enzima Glutatión Transferasa M1 (*GSTM1*) (Bartsch H, et al. 2000), que transforma este metabolito BaP en un conjugado con glutatión más soluble y excretable vía biliar. **(Fig. 31)**

Por tanto, la mayor actividad de CYP1A1, así como la ausencia de actividad *GSTM1* han sido asociadas con riesgo aumentado de cáncer pulmonar (Quiñones L, et al. 2006).



**Fig. 31.** Vía de metabolización de metabolitos del humo del tabaco.

Fuente: 228 (Quinones et al. 499-515)

La deficiencia de isoformas  $\mu$  (GSTM1), frecuentemente detectada en pacientes con cáncer de pulmón, ha llevado a proponer a esta enzima como marcador biológico de predisposición a padecer este tipo de cáncer en personas expuestas (Lu C, et al. 2006).

Diversos artículos muestran una posible relación entre cáncer de colon y los dos polimorfismos de GST mencionados. Ciertos estudios de revisión (Cotton SC, et al. 2000; Ates NA, et al. 2005), concluyen que los factores de susceptibilidad como la exposición directa a tóxicos, relacionados con diferentes enzimas polimórficas GST son predisponentes para el cáncer colorrectal.

#### 1.10.2 POLIMORFISMOS DE LA ENZIMA QUINONA OXIDOREDUCTASA 1 (NQO1):

Esta enzima está codificada por un gen polimórfico del cromosoma 16q23, del que se conocen numerosos polimorfismos de nucleótido sencillo. Uno de los polimorfismos más conocidos ocurre en el nucleótido 609 (codón 187) y consiste en un cambio de bases C>T, que da lugar al cambio de aminoácido prolina por serina (Ross D,

et al. 1996). La actividad de NQO1 es normal en individuos con el genotipo salvaje (*NQO1\*1\*1* o *NQO1/CC*), pero se reduce su actividad en individuos que posean la variable heterocigota (*NQO1\*1\*2* o *NQO1/CT*) llegando a la actividad enzimática nula de la quinona reductasa en individuos con la mutación homocigota (*NQO1\*2* o *NQO1/TT*).

La frecuencia para individuos del norte de Europa y caucásicos americanos del gen salvaje es de 0.79, frente a 0.21 para el alelo mutado (Traver RD, et al. 1997). Es sabido que la frecuencia del alelo mutado es ligeramente mayor en afroamericanos y considerablemente mayor en amerindios y asiáticos (Kelsey KT, et al. 1996).

La expresión de la enzima NQO1 está condicionada por el estrés oxidativo y el número de ROS, de manera que un aumento de estas induce un aumento de la producción de la enzima, mostrándose por tanto como un agente protector frente a quinonas y bencenos derivados. Diversos estudios epidemiológicos evidencian que la disminución y/o anulación de la actividad de esta enzima puede ocasionar un aumento del riesgo a desarrollar diversos tipos de cáncer en relación con la exposición y un desequilibrio en el control de ROS. En un metaanálisis (Yang FY, et al. 2012) estudian la presencia del alelo T y una incidencia mayor de cánceres digestivos (esófago, laringe, estomago o colorrectal), siendo especialmente significativo en europeos y asiáticos, especialmente cuando hablamos de cáncer gástrico.

### 1.10.3 POLIMORFISMOS DE LA ENZIMA PARAOXONASA SÉRICA/ARILESTERASA 1 (PON1):

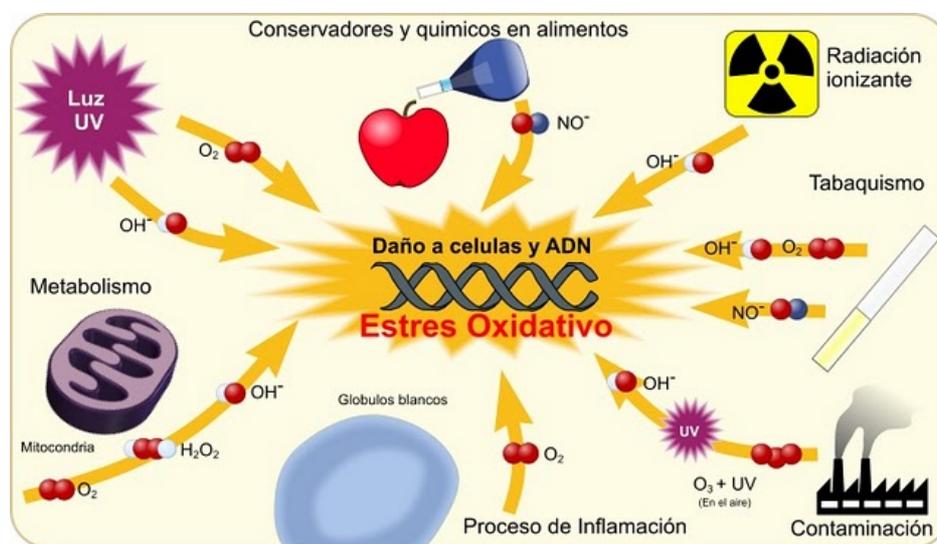
El locus génico que codifica dicha enzima está situado en la región 21.3 del cromosoma 7q. Dentro de los más de 200 SNPs en diferentes regiones del gen *PON1*, los polimorfismos más estudiados se sitúan en las posiciones 192 y 55 de la región codificante y en la región promotora -108 (Humbert R, et al. 1993).

El primero de ellos consiste en la sustitución de glutamina (Q) por arginina (R) en el codón 192 que determina diferente actividad hidrolítica hacia varios sustratos

(Humbert R, et al. 1993). El alelo Q es menos eficiente que el R para hidrolizar el paraoxón, pero más eficiente frente a diazoxón, somán y sarín. Por tanto, el alelo normal rs662A codifica para glutamina, mientras que la variante rs662G lo hace para arginina.

El polimorfismo genético va a determinar una posible disminución de la capacidad metabolizadora de la enzima que puede ser especialmente relevante bajo la exposición a pesticidas tipo paratión aumentando así el daño ocasionado por radicales libres.

El aumento del estado de estrés oxidativo afecta directamente la integridad genómica mediante diferentes procesos: induciendo entrecruzamientos de la cromatina y la oxidación de bases nitrogenadas, como la oxidación de residuos guanina a 7-hidro-8-oxoguanina (8-oxo-Gu) que conlleva luego a la transversiones de G:C a T:A, provocando así mutaciones. A estos efectos habría que añadir posibles rupturas de las hebras del ADN (Shen HM, et al. 1999), y/o formación de aductos con el ADN (**Fig. 32**)



**Fig. 32.** Modelo de asociación entre el daño oxidativo de agentes exógenos y posible daño al ADN con la consecuente predisposición al cáncer.

Fuente: Modificado de (Shen HM, et al. 1999)

La evidencia científica ha observado asociación entre la variante alélica mutada rs662G, que determinan una baja actividad de PON<sub>1</sub>; y el riesgo de cáncer de mama por

reducción en la eliminación de carcinógenos ambientales que pueden entrar en contacto con el organismo por ingestión o contacto (Alavanja MC, et al. 2012). Otro estudio muestra la asociación de este mismo alelo rs662G con un mayor riesgo a desarrollar cáncer de próstata a causa de la disminución de la actividad de detoxificación de la enzima y su relación con los factores dietéticos (Stevens VL, et al. 2008), estilos de vida y exposición ambiental.

#### 1.10.4 POLIMORFISMOS DE LA ENZIMA EPÓXIDO HIDROXILASA MICROSOMAL 1 (*EPHX1*).

El gen que codifica dicha enzima está situado en la región 42.1 del cromosoma 1q. Existen más de 110 polimorfismos SNPs en el gen *EPHX1*, de los cuales dos han sido los más estudiados. Uno de ellos, presente en la posición 337 (codón 113) consiste en el cambio T>C en el exón 3 que provoca la sustitución de una tirosina por histidina y se identifica con el número rs1051740 (Hassett C.1, et al. 1994), mientras que el otro en la posición 415 (codón 139) consiste en el cambio A>G que produce una sustitución de una histidina por arginina (rs2234922). En el primero de estos polimorfismos, el cambio de tirosina provoca disminución de la actividad por lo que este alelo es conocido como el "alelo lento", ya que *in vitro* esta sustitución conlleva una disminución en la actividad de la enzima de entre 40-60% (Hassett C.2, et al. 1994). Teniendo en cuenta el efecto diferencial conocido de los genotipos de *EPHX1* en la desintoxicación de procarcinógenos, se ha propuesto que estos polimorfismos funcionales pueden tener relación con el posible desarrollo de procesos cancerosos (Benhamou S, et al. 1998).

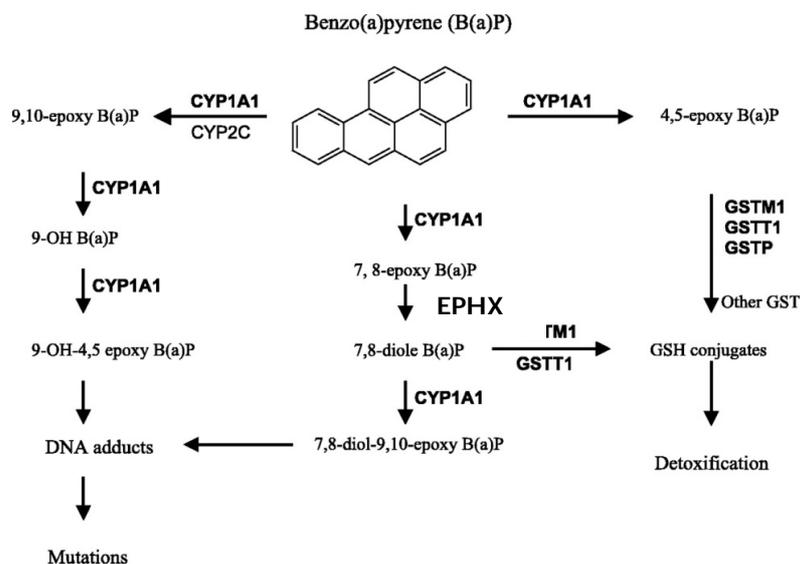
El papel de los polimorfismos de *EPHX* en relación con el metabolismo de sustancias con potencial carcinogénico tiene que ser evaluada cuidadosamente porque según la situación el efecto puede ser diferente. Esto es debido a la doble función de la epóxido hidrolasa en la bioactivación y detoxificación de sustancias carcinogénicas.

Enzimáticamente, *EPHX* cataliza la hidrólisis de epóxidos a trans-dihidrodiol. Sabemos que los epóxidos son sustancias altamente inestables y reactivas que pueden formar aductos con el ADN. Aunque la conversión de los epóxidos es frecuentemente

una reacción de inactivación, los metabolitos trans-dihidrodiol pueden sufrir posteriores activaciones por los complejos enzimáticos citocromos P450, y dar lugar a intermediarios electrofílicos que pueden unirse de forma covalente al ADN (Adkins S, et al. 1993). Por tanto hay que diferenciar entre los alelos asociados con alta actividad y con baja actividad:

- Alta actividad: genotipo homocigoto Tyr113Tyr.
- Actividad enzimática disminuida: genotipo homocigoto mutado His113His ó o bien el genotipo heterocigoto His113Tyr; siendo ambos considerados como el "alelo lento".

- Los individuos portadores de **alelos de alta actividad** (o actividad normal) parecen presentar un mayor riesgo a desarrollar ciertos tipos de cánceres asociados con la activación de componentes mutagénicos del tabaco como el benzopireno (González FJ, et al. 2001). (**Fig. 33**)



**Fig. 33.** Vía metabólica del Benzopireno proveniente del humo del tabaco.

Fuente: (González FJ, et al. 2001)

ivación

metabólica del metabolito activo final del BaP. Inicialmente se cataliza la conversión de benzopireno de distintas fuentes a un epóxido (7,8-epoxi) por la enzima del citocromo P450 A1 (CYP1A1). A continuación, la enzima EPHX lo convierte en 7,8-diol-BaP para que este compuesto sea metabolizado por el CYP1A1 en 7,8-diol-9,10-epóxido-BaP,

metabolito altamente reactivo que puede dañar al ADN, ARN y a proteínas mediante la formación de aductos como con la guanina en el carbono 8.

Esta vía metabólica muestra la posible relación entre la alta actividad y riesgo de cáncer, relacionados con consumo de tabaco. En concreto se ha observado que pacientes con exposición al humo del tabaco (fumadores) o individuos con una dieta alta en HAP tienen un incremento en el desarrollo de cáncer de pulmón en presencia de polimorfismos *EPHX* de alta actividad (Hecht SS, et al. 2014). Esto es debido a que la alta actividad de *EPHX*, genera un mayor número de moléculas de BaP como consecuencia de la propia vía de metabolización; que se asocia con un mayor número de aductos formados en el ADN de leucocitos tal y como muestra en su estudio Zhou (Zhou W, et al. 2001). Sus resultados muestran la asociación del polimorfismo que confiere alta actividad como factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón en individuos expuestos al tabaco. No solo se vio asociación con los PHAs del humo de tabaco, ya que además, en el estudio de Kuljukka-Rabbet, se confirmó una relación entre el grado de actividad enzimática de la enzima ocasionada por su polimorfismo y los niveles de aductos en linfocitos de trabajadores de los hornos de coque (Kuljukka-Rabbet T, 2002),.

- En cuanto a los individuos portadores de alelos de **baja actividad**, estos parten de una disminución de la actividad enzimática que puede ejercer un efecto protector o por lo menos no aumentar el riesgo de diversos tipos de cáncer. Varios estudios muestran que el genotipo heterocigoto (Tyr113His) está asociado con un menor riesgo de cáncer de pulmón (Kiyohara C, et al. 2006). Por otro lado, el estudio de Zhou observó que el genotipo de muy baja actividad, el homocigoto His113His, puede ejercer un papel protector en fumadores (Zhou, et al. 2001)

-

## 1.11 POLIMORFISMOS EN GENES DE REPARACION Y SÍNTESIS DEL ADN.- RIESGO DE CANCER

Los sistemas de reparación de daños al ADN determinan en parte el grado de daño ocasionado por la exposición a agentes ambientales con potencial cancerígeno. Esto es debido a que estos mecanismos forman la “segunda línea” de defensa a posibles efectos tóxicos complementando así los mecanismos de metabolización. Por tanto, la respuesta individual al daño en el ADN inducido por agentes xenobióticos está también condicionada por la eficacia de los sistemas de reparación.

De nuevo, los SNPs de las enzimas implicada en estos procesos de reparación van a determinar su capacidad funcional, pudiendo conducir a una menor capacidad de reparación del ADN, que puede ser la base de una tasa de mutación más alta y como consecuencia última provocar un aumento de riesgo de desarrollo de procesos tumorales (Karahalil B, et al. 2012).

Se han descrito varios polimorfismos genéticos en enzimas que participan en los mecanismos de reparación y síntesis del ADN que son objeto de nuestro estudio:.

- Xeroderma Pigmentosum Grupo A: *XPA*-rs1800975
- Excision Repair Cross-Complementing: *ERCC5*-rs17655
- Metionina Sintetasa: *MS*-rs1805087

### 1.11.1 POLIMORFISMO DE LA ENZIMA *XERODERMA PIGMENTOSUM* GRUPO A (*XPA*):

El gen *XPA* está localizado en el brazo largo del cromosoma 9, en la región 22.3. Es un gen polimórfico, pero sus mutaciones son de escasa incidencia. Inicialmente se comprobó que los individuos con mutación en estos genes presentaban una extrema sensibilidad al sol y una mayor incidencia de cáncer de piel (Dusinska M, et al. 2006). Hoy día se conocen 7 SNPs para esta enzima que pueden tener efectos sobre la eficiencia del mecanismo NER, y que condicionan por tanto los mecanismos de reparación por daño al ADN.

En el estudio de Butkiewicz, describieron dos polimorfismos en *XPA* que afectaban a la funcionalidad del sistema NER (Butkiewicz D, et al. 2000). Uno de ellos aparece con una frecuencia escasamente superior al 1% y es causado por una sustitución de A por G en el codón 709 (CGA-->CAA). Su poca incidencia poblacional impide su estudio. En cambio existe otra variante que es mucho más común. Se trata del polimorfismo A23G, conocido como rs1800975, que se localiza en la región 5' no codificante del gen 9q22.3 y que consiste en un cambio de A por G en la posición 23, de tal forma que en la población pueden presentarse los genotipos silvestre 23AA, heterocigoto 23AG y homocigoto mutado 23GG, siendo la frecuencia del alelo 23A entre caucásicos de 0.368 (95% CI = 0,308 a 0,429), aunque el genotipo salvaje no es el mayoritario.

El polimorfismo *XPA* A23G rs1800975, ha sido investigado para evaluar su potencial riesgo al desarrollo de cáncer. Se ha observado un alto riesgo de cáncer de pulmón para la variante alélica A silvestre (Liu J, et al. 2012), y por tanto una reducción de riesgo en el desarrollo de cáncer de pulmón para la variante minoritaria.

Posiblemente, la explicación al efecto protector que muestran las variantes mutadas es que el polimorfismo *XPA* 23AA silvestre parece predisponer a la aparición de mutaciones en el gen *TP53* y contribuir a la carcinogénesis pulmonar (Cho S, et al. 2011). *TP53* es un gen que aparece mutado en aproximadamente un 50% de los cánceres de pulmón y es un marcador de peor pronóstico y mala respuesta al tratamiento.

Aunque el mecanismo responsable de la asociación entre el consumo de tabaco, la presencia del polimorfismo 23AA y el riesgo de cáncer de pulmón queda aún por esclarecer, existe evidencia científica que muestra que el genotipo *XPA* 23AA tiene un efecto más claro en el riesgo de cáncer de pulmón en individuos más jóvenes que los sujetos de mayor edad (Park JY, et al. 2002). Por otro lado, el efecto protector del genotipo *XPA* 23GG mutado, fue mayor en los fumadores más activos, lo cual hace pensar que el polimorfismo mutado protege más (Wu X, et al. 2003).

Sin embargo, el efecto de las variantes polimórficas es perjudicial cuando se trata de metabolizar la formación de posibles aductos provenientes de los tratamientos de quimioterapia con cisplatino. En estas situaciones, la variante alélica del gen *XPA* 23G está asociadas con mayor probabilidad de enfermedad quimiorresistente (hasta 30% de los casos) frente al alelo silvestre 23A (solo un 6% de los casos) (Monzon M, et al. 2006). Los individuos con el genotipo silvestre tienen menor capacidad de corrección de aductos en el ADN, ya que su presencia conduce a una proteína menos activa, lo que disminuye la capacidad de eliminación de aductos voluminosos y por lo tanto, de modular la sensibilidad a la quimioterapia basada en platino (Feng J, et al. 2009). Por ello, la probabilidad de sufrir una enfermedad quimiorresistente es mucho menor en los portadores del genotipo heterocigoto (AG) y aun menor en los pacientes con el genotipo con la variante en homocigosis (GG).

Estos datos pueden proporcionar un medio de identificación de un subgrupo de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) que puedan beneficiarse de la quimioprevención individualizada o estrategias de tratamiento.

Los individuos con el genotipo 23GG (mutado) tienen una capacidad de reparación del ADN superior a los portadores del genotipo AA (Park JY, et al. 2002; Wu X, et al. 2003). Además, el alelo G tiene un promotor de la actividad elevada, lo que podría ser debido a que el alelo 23G tiene una capacidad mayor de iniciación de la traducción, de este modo aumentar la concentración de proteína *XPA* (Feng J, et al. 2009). Por tanto, existe evidencia científica del papel de este polimorfismo *XPA*23 A>G sobre el funcionamiento del mecanismo NER y por tanto de la reparación del ADN.

#### 1.11.2 POLIMORFISMO DE LA ENZIMA EXCISION REPAIR CROSS-COMPLEMENTING (*ERCC5*):

El gen que codifica dicha enzima es *ERCC5/XP*. Se localiza en el cromosoma 13q-q33.1. Es un gen polimórfico del que se han identificado varios polimorfismos, de los que dos son los más estudiados: la sustitución T335C (His46His, rs1047768) y G3507C (Asp1104His, rs17655). La distribución genotípica del polimorfismo rs17655 es

1104 GG ó Asp1104Asp (silvestre), heterocigoto 1104 GC ó Asp1104AHis y homocigoto mutado 1104 CC ó His1104His (Gowda S, et al 2007).

Este polimorfismo afecta a la zona C-terminal de la proteína que es necesaria para las interacciones entre los componentes *XPG/ERCC5* y otras proteínas de la vía NER, tales como la subunidad TFIIH (Wakasugi M, et al. 1999). El polimorfismo puede afectar a las interacciones proteína-proteína y alterar la funcionalidad del mecanismo de reparación, lo que puede predisponer a los individuos con variantes subóptimas al desarrollo de varios tipos de cáncer (Devlin T, 2000).

Las consecuencias funcionales de la sustitución de aminoácidos Asp1104His están respaldadas por programas de análisis de función de cálculo como el SIFT (Kumar P, et al 2009). Este programa predice si una sustitución de aminoácido afecta la función de la proteína. Se basa en el grado de conservación de residuos de aminoácidos en la secuencia de alineaciones derivadas de secuencias estrechamente relacionadas, recogidos a través de PSI-BLAST.

Se ha estudiado la correlación entre la presencia del polimorfismo, *ERCC5* y el riesgo a desarrollar numerosos tipos de cáncer como el cáncer de mama, pulmón, piel y vejiga (Zhu ML, et al. 2012); y aunque no se encuentran diferencias significativas, sí parece que las variantes del polimorfismo *ERCC5* Asp1104His confieren susceptibilidad al desarrollo de algunos cánceres.

### 1.11.3 POLIMORFISMOS DE LA ENZIMA METIONINA SINTASA O SINTETASA (MS):

El gen que codifica dicha enzima está localizado en el cromosoma 1q43, es un gen polimórfico (Lu M, et al. 2010). Uno de los polimorfismo en el gen que codifica esta enzima es el ocasionado por un cambio de adenina por guanina en la posición 2756 (rs185087), el resultado es la sustitución del aminoácido aspartato de la posición 919 por glicina. Está relacionado con alteraciones en las vías de metabolización del folato teniendo como consecuencia defectos en la metilación y también en el posible desarrollo de cáncer (Harmon DL, et al. 1999). El cambio producido es de A por G, de tal manera que provoca que existan 3 genotipos diferentes; el genotipo silvestre 2756AA, el heterocigoto mutado 2756AG y el homocigoto mutado 2756GG.

Inicialmente se pensó que las variantes polimórficas 2756AG y 2756GG en la MS se asociaban con disminución de la actividad enzimática con respecto a su forma genotípica 2756AA silvestre. Esta disminución de la actividad ocasiona elevación de homocisteína en suero e hipometilación del ADN (Zingg JM, et al. 1997). Esto fue corroborado por el estudio de Paz, en el que se concluye que los individuos portadores de SNP 2756GG mostraban una frecuencia más baja de hipermetilación en los genes supresores de tumores (Paz MF, et al. 2002). Por tanto, las variantes polimórficas provocan disminución de la actividad enzimática y como consecuencia una disminución de la metilación del ADN.

Por ahora, hay un gran número de estudios epidemiológicos para evaluar el papel del polimorfismo MTR rs185087 en diferentes tipos de neoplasia. Sin embargo, la asociación entre el polimorfismo y el riesgo de cáncer sigue siendo controvertida (Yu K, et al. 2010).

Esta controversia puede explicarse en parte atendiendo a las diferencias étnicas, ya que muchos factores pueden contribuir al hecho de que el mismo polimorfismo tiene diferentes frecuencias genotípicas en diferentes poblaciones étnicas, así se han observado mayores porcentajes de la variante minoritaria en poblaciones europeas ( $\approx 20\%$ ) y menor porcentaje en poblaciones asiáticas ( $\approx 15\%$ ). También hay que tener en cuenta la heterogeneidad clínica, la edad, la proporción de sexos, la dieta, año de aparición y gravedad de la enfermedad. Además, los factores ambientales como la exposición excesiva a tóxicos puede provocar un aumento de la actividad enzimática de corrección del ADN y, por esta razón, el fallo en los mecanismos de reparación puede favorecer la perpetuidad de mutaciones.

Diversos estudios han constatado que el genotipo A2765G MS puede ser un factor de reducción del riesgo de cáncer en las poblaciones europeas para diversos tipos de cáncer incluidos el cáncer colorrectal (Chen K, et al. 2005), pulmón (Suzuki T, et al. 2007), mama (Moore LE, et al. 2007) o cáncer de estómago (Zhang LE, et al. 2007). En cambio, otros trabajos indican una asociación positiva entre los cánceres de cabeza, cuello y laringe; y la presencia del genotipo de A2756G MS, en las poblaciones asiáticas (Kruszyba L, et al. 2010).

# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

El actual avance de las técnicas de biología molecular permite una caracterización individualizada del diagnóstico y pronóstico de diferentes tipos de tumores originados por alteraciones del material genético. Permitiendo establecer interrelaciones entre estas variantes genéticas, diferentes tipos de exposición (tabaco, zona de residencia, sustancias químicas o laboral), y la mayor susceptibilidad o incidencia al desarrollo de enfermedades hematológicas, en concreto de células B maduras, como los Linfoma No Hodgkin.

### Objetivos:

- Determinar si la presencia de genotipos de *GSTT1* constituye un factor de riesgo para el desarrollo de neoplasias maduras de células B en individuos expuestos. Considerando como factores de exposición: al tabaco, el residir en una zona próxima donde exista alta concentración de industrias químicas; o bien, por exposición ocupacional.
- Conocer la asociación entre los polimorfismos asociados a *PON1* y el riesgo de linfoma en individuos expuestos.
- Comprobar el efecto de los polimorfismos en genes de reparación y síntesis del ADN en el riesgo de padecer cáncer.

### Objetivos necesarios para el estudio:

- Obtener una población de estudio, compuesta por Casos y Controles en número adecuado, comparables en edad, sexo, origen, etc. Evitar en todo momento cometer el error de recogida o sesgo de selección en la población.
- Caracterizar a ambos grupos según diferentes tipos de exposición mediante una encuesta breve y anónima.

- Extracción de ADN y genotipado de las muestras de casos y controles a estudio, utilizando para ello diversas técnicas moleculares.
- Comparar un grupo de casos y un grupo control en función de la presencia de diferentes polimorfismos genéticos en enzimas de metabolización y reparación de ADN.

# MATERIALES Y MÉTODOS



### 3. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio es un estudio retrospectivo-descriptivo observacional realizado sobre 392 sujetos divididos en dos grupos, un grupo de casos frente a un grupo de controles. El objetivo es comparar ambas poblaciones en función de la presencia de diferentes polimorfismos genéticos en enzimas de metabolización y reparación de ADN, con el fin de encontrar posibles interrelaciones entre estas variante genéticas, diferentes tipos de exposición (tabaco, zona de residencia, sustancias Químicas o laboral) y la una mayor susceptibilidad o incidencia al desarrollo de enfermedades hematológicas de células B maduras.

- Procedencia de las muestras
  - Criterio de selección de los controles
  - Criterio de selección de los casos
- Zona elegida de estudio
- Definición de exposiciones

#### 3.1 PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS:

Las muestras de la población estudiada han sido obtenidas de la población de la región de Murcia; en concreto de dos área de salud de dos hospitales de la región de Murcia, Hospital Universitario Santa María del Rosell (Cartagena) y Hospital General Universitario Morales Meseguer (Murcia), y por otro lado de población que acudió a los centros de donación de Sangre de dicha región. Tanto el grupo de casos como el grupo de controles pertenecen a las diferentes áreas de salud del sistema Murciano de Salud y han sido seleccionados en función de los criterios de emparejamiento que exigen los estudios de casos y controles. El cumplir estos criterios restrictivos es necesario para evitar los sesgos de confusión que puedan generarse en la elección de ambos grupos de estudio.

**Criterio de selección de los Controles:**

Los controles seleccionados para el estudio son individuos sanos que acudieron a centros de donación de sangre, que forman parte del Centro de Hemodonación de Murcia. Este centro tiene su sede en Murcia capital, y una red periférica de centros repartidos por los diversos hospitales de la región. La inclusión en el estudio fue debidamente comunicada, y voluntariamente firmaron un consentimiento informado para poder ser incluidos en el estudio.

**Criterio de selección de los Casos:**

Los casos son pacientes que fueron diagnosticados entre 2004 y 2009 en dos Hospitales de la Región de Murcia; el Hospital Universitario Santa María del Rosell (Cartagena) y el Hospital Universitario Morales Meseguer (Murcia). El diagnóstico se llevó a cabo por los facultativos especialistas de los Servicios de Hematología, en función de los criterios de clasificación de enfermedades onco-hematológicas realizada por las sociedades europeas y norteamericanas de Hemato-patología. Esta clasificación es conocida como de la REAL (Besses C, et al 1994), y está catalogada por la World Health Organization – Organización Mundial de la Salud, (WHO-OMS) (Willemze R, et al. 2005). Reconoce tres categorías basándose en la morfología y el linaje celular:

- Neoplasias de células B.
- Neoplasias de células T y células NK.
- Linfoma de Hodgkin.

Dentro de las categorías de células B y T, se reconocen a su vez dos subdivisiones:

- Neoplasias de células precursoras: Corresponden a los estadios más tempranos de diferenciación.
- Neoplasias de células B diferenciadas o maduras.

En nuestro estudio, el criterio de clasificación de los casos seguido esta hecho en función de la categoría de Neoplasias de células B maduras, pues los pacientes son

enfermos de alguna neoplasia de este tipo. Dentro de esta categoría se distinguen específicamente varios tipos (Masque-Soler N, et al. 2013):

- Linfoma de Hodgkin:

Es un cáncer del sistema inmunitario que se caracteriza por la presencia de un tipo de célula llamada célula específica de Reed Sternberg. Se caracterizan dos tipos principales de enfermedad de Hodgkin están: el linfoma de Hodgkin clásico y el linfoma de Hodgkin ganglionar con predominio de linfocitos.

- Linfoma no Hodgkin:

Los linfomas no Hodgkin (LNH) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas linfoproliferativas que tienen diferentes modelos de comportamiento y respuestas al tratamiento. El LNH también se origina habitualmente en los tejidos linfoides y se puede diseminar hasta otros órganos. Sin embargo, el LNH es mucho menos previsible que el linfoma de Hodgkin y tiene predilección mucho mayor por diseminarse hasta sitios extraganglionares. El pronóstico depende del tipo histológico, el estadio y el tratamiento. El linfoma no Hodgkin (LNH) incluye los siguientes subtipos:

- *Linfoma Folicular*: Representa el 22% de los LNH en todo el mundo. La manifestación más frecuente son las adenopatías indoloras de aparición reciente. Cualquier órgano puede resultar afectado. La mayoría de los pacientes no sufren síntomas como fiebre, sudores ni pérdida de peso. Supervivencia de 72% a los 5 años.
- *Linfoma difuso de células B grandes*: Es la variedad más frecuente de LNH, representa aproximadamente un tercio de los casos. Puede aparecer como un proceso primario de los ganglios linfáticos o como un linfoma extraganglionar.

En el estudio se han incluido un total de 215 pacientes caucásicos afectados por enfermedad neoplásica de células B maduras. De entre ellos 194 casos fueron diagnosticados de Linfoma no Hodgkin y 21 casos de Linfoma Hodgkin. Estos

pacientes, en su mayoría, son residentes en Cartagena y alrededores, en el sureste de España.

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética Local y se obtuvo el consentimiento informado. Al grupo de casos se les expuso el fin del trabajo investigador y se les pidió su colaboración con un breve cuestionario simple sobre hábitos de vida; rápido y totalmente anónimo, con el objeto de definir posibles exposiciones. En el cuestionario se incluyeron preguntas sobre antecedentes de tabaquismo, la ocupación y la exposición a compuestos químicos y pesticidas, antiguos y actuales lugares de residencia. Este último dato se confirmó mediante la búsqueda en los registros clínicos ya que cada individuo tiene un centro de salud de referencia asignado según la dirección de la residencia.

### 3.2 ZONA GEOGRÁFICA ELEGIDA DE ESTUDIO:

Para el estudio etiológico escogimos una zona con evidentes antecedentes de exposición a tóxicos, tanto industriales como a pesticidas por ser una zona agrícola. Este sector en concreto corresponde al Área de Salud II (300.000 habitantes) y comprende dos zonas conocidas como:

- "Campo de Cartagena", un área importante de cultivo de hortalizas y donde es más que presumible el uso de abonos químicos y pesticidas.

- El "Polo Químico" de Cartagena, constituye uno de los polos químicos más grandes de España. Se encuentra situado geográficamente en el Valle de Escombreras y está formado por numerosas plantas químicas que comprenden una de las zonas con más densidad de las industrias químicas pesadas en España (López-Abente G, et al. 2005; López-Abente G, et al. 2006). El Valle de Escombreras y alrededores fue declarado por el consejo de Gobierno en 1979 como "Zona de Atmosfera Contaminadas" y sujeta a un "Especial Control ambiental" y por lo tanto están sujetos al control riguroso y monitoreo de contaminantes atmosféricos (BOE, 1979). Como área de control exhaustivo, cuenta desde 1990 con un Plan Operativo de Intervención Industrial (BO-Murcia, 1990), que obliga a parar la actividad industrial cuando se superan los límites admisibles. A modo de ejemplo, mencionar que durante el año 1999

se tuvo que parar la producción industrial en 81 ocasiones la mayoría de las veces por niveles inadmisibles de partículas en suspensión.

Entre las industrias allí localizadas se encuentran una refinería de petróleo, una planta generadora de electricidad mediante combustión de petróleo, una industria de producción de fertilizante nitrogenado y fosfórico, así como una fábrica de biodiesel y una planta de extracción/purificación de zinc mediante limpieza con ácido sulfúrico. De hecho, los óxidos de nitrógeno como NO<sub>2</sub>, dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), Acido Clorhídrico (HCl), y otros compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como el benceno, mercaptanos y otras partículas de tamaño más pequeño que 10 micras (PM10), están entre los contaminantes más comunes en este área. Estudios previos han confirmado una mayor incidencia de cáncer en esta zona y en los municipios vecinos en comparación tanto con la media nacional (Tormo MJ, et al. 1991).

### 3.3 DEFINICIÓN DE EXPOSICIONES:

La definición de los criterios de exposición no es una elección fortuita, ya que diversos estudios relacionan un grado de exposición a determinados agentes con el desarrollo de diversos tipos de tumores (pulmón, próstata, vejiga, estómago y colon), en la región a estudio en comparación con otras zonas (Tormo MJ, et al. 1991).

Consideramos a los individuos expuestos aquellos que cumplen alguno de los tres criterios de exposición, que se definen a continuación:

#### **A) Exposición al tabaco:**

Consideramos expuestos al tabaco a los individuos que fumaban todos los días más de cinco cigarrillos durante un periodo de más de 5 años.

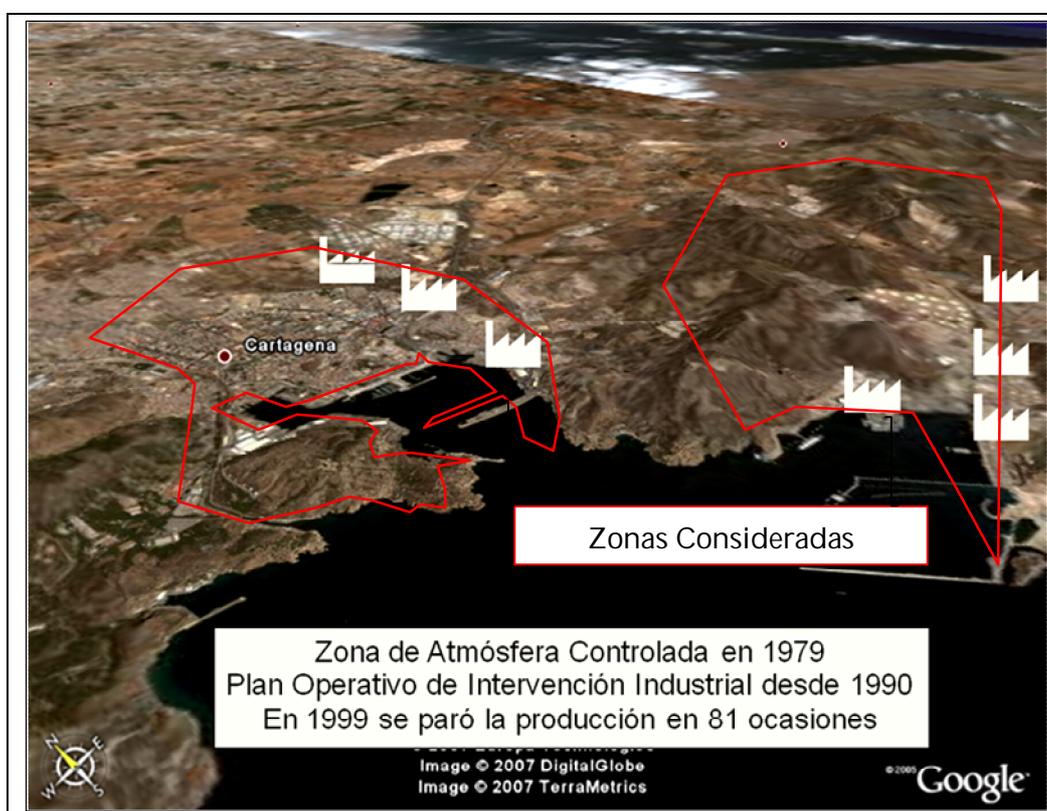
#### **B) Exposición por "zona de residencia":**

Este criterio incluye el hecho de vivir o haber vivido dentro de la "zona atmosférica contaminada" durante 10 años o más. La categoría de "expuestos por zona de residencia" es elegida en base al Área 2 de salud de la región de Murcia, la elección de esta zona para este tipo de estudios no es el azar; la zona regional adyacente a Cartagena es una zona que ya desde el año 1973 y por iniciativa de la Escuela Universitaria Politécnica empezaron a medirse los niveles de emisión en su propio

edificio, y fue 1974 cuando la Subdirección General de Medicina Preventiva y Sanidad Ambiental creó una unidad técnica de análisis y recepción de datos. En 1990 dicha zona fue declarada dentro de un contexto de un Plan Operativo de Intervención Industrial que obliga a parar la actividad industrial cuando se superan los límites admisibles, dicha zona fueron declaradas en 1990 como “Zona de Atmósfera Contaminada” por el Consejo de Ministros (BO-Murcia, 1990).

Según el estudio “Atlas municipal de mortalidad por cáncer en España” (1989-1998) realizado por el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III, los habitantes de Cartagena tienen un riesgo un 50% mayor que el resto de la población española de padecer cáncer de pleura. Así mismo también esta zona supera la media nacional en riesgo de cáncer de pulmón, colon-rectal, melanoma, útero, próstata, vejiga, mieloma múltiple y leucemias.

Por tanto, se han considerado para el estudio como expuestas las localizaciones geográficas de residencia enmarcadas dentro de las “Zonas de Atmósfera Contaminadas” según la Ley 1979 (BOE, 1979). (Fig. 34)



**Fig. 34.** Zonas de Atmósfera de especial control.  
Fuente: Modificado de Google Earth.

### **C) Exposición ocupacional:**

La exposición profesional es considerada como una de las causas de cáncer debido al entorno más frecuente según la OMS (Tormo MJ, et al. 1991), tanto es así que se considera que el 19% de los cánceres son atribuibles a factores ambientales, incluido el entorno laboral.

En nuestro estudio, la exposición laboral se consideró relevante como posible factor causal para el desarrollo de patologías hematológicas. Consideramos individuos expuestos laboralmente a aquellos que en el cuestionario respondieron estar o haber estado expuestos a compuestos químicos diariamente y que ejercían su labor en alguna de las siguiente actividades: industria química (expuestos a hidrocarburos aromáticos o solventes), la construcción (en contacto con la pintura, barniz, polvo de madera, o yeso), la agricultura (uso de pesticidas y fertilizantes) y/o metalurgia (soldadores, herreros, chapistas y trabajadores de astilleros).

#### **3.4 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS MÁS SIGNIFICATIVOS:**

La selección de polimorfismos se hace sobre la base de una Odds Ratio (OR) mayor de 1.8 y una frecuencia en la población caucásica mayor del 10%. Se han seleccionado SNPs de enzimas relacionadas con el metabolismo de tóxicos; o bien, del grupo de enzimas que corrigen los daños ocasionados por dichos tóxicos o enzimas de reparación de daños en el ADN.

#### **Metabolización de xenobióticos:**

Numerosos sistemas enzimáticos forman parte del conjunto de vías metabólicas por medio de los cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico no polar, facilitando su solubilidad en agua. Este estudio se basa en la presencia de los polimorfismos de los genes que codifican a las siguientes enzimas:

- GSTT1 y GSTM1: Conocidas como Glutación-transferasas participan en la desintoxicación de compuestos electrofílicos, incluyendo los agentes

carcinógenos, drogas terapéuticas, toxinas ambientales y de especies reactivas del oxígeno; todo ello gracias a su conjugación con glutatión.

- NQO1: También llamada quinona oxidoreductasa 1 o diaforasa (NQO1). Esta implicada en la activación/detoxicación de quinonas (por ejemplo, mitomicina C) y de compuestos activos similares, incluyendo los metabolitos del benceno (hidrobenzoquinona, benzoquinona).
- PON1: Llamada paraoxonasa. Es una enzima implicada en la hidrólisis del metabolito oxigenado (oxón) a nivel hepático y sérico de diversos insecticidas órgano-fosforotiónatos (entre ellos el paratión, clorpirifos, diazinón).
- EPHX1: Epóxido hidrolasa microsomal 1. Juega un papel importante tanto en la activación y detoxificación de compuestos aromáticos policíclicos, como son los carcinógenos epóxidos derivados de la exposición al tabaco.

### **Reparación de daño en el ADN:**

Estas enzimas de reparación de ADN, se encargan de detectar y subsanar alteraciones a nivel de bases nitrogenadas así como rupturas en el esqueleto del ADN.

- XPA: Xeroderma Pigmentosum, forma parte de los sistemas de reparación del DNA, son proteínas que escanean el DNA para detectar alteraciones.
- ERCC5: Excision repair cross-complementing, forma parte de un grupo de proteínas implicadas en la reparación y escisión del DNA; está involucrado en el mecanismo de reparación por escisión de nucleótidos (NER).
- MS: Es la enzima metionina sintetasa, que cataliza la conversión del aminoácido homocisteína (Hcy) en metionina (Met) mediante la transferencia de un grupo metilo.

### 3.5 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Para el estudio de polimorfismos genéticos es necesario muestras de sangre periférica, ya que el genotipo de ADN se obtiene de las células de línea blanca. Como

son necesarias muestra de sangre sin coagular, se emplean tubos de 5 ml de hemograma, anticoagulado con EDTA tripotásico (Eppendorf). La placa leucoplaquetar se obtiene mediante centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos empleando la centrifuga Sorvall TC6.

### **Extracción de ADN:**

El ADN genómico total se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica utilizando el sistema automático de extracción de ADN Maxwell 16 y el kit de extracción de ADN de muestras de sangre (cat: AS1010) (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN se realizó por absorbancia UV usando el Biophotometer (Eppendorf, Hilden, Alemania). Se realizó la extracción de ADN de las muestras de la capa leucoplaquetar. Este proceso se llevo a cabo mediante dos métodos:

- El método del Salting-out\* (realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante) se ha llevado a cabo utilizando el sistema de extracción automática del DNA Maxwell 16 y el kit de extracción del DNA para muestras de sangre (cat: AS1010) (Promega, Madison, USA)
- Método de purificación en columna Qiagen\* (realizado de acuerdo a las instrucciones del fabricante) se ha llevado a cabo empleando el Kit Quiamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) y el equipo automatizado Quiacube (Qiagen, Hilden, Alemania).

La cuantificación del ADN fue llevada a cabo mediante metodología de absorbancia UV utilizando el espectrofotómetro Biophotometer (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

La concentración y el grado de contaminación proteica del ADN se calculó tras medir su absorbancia a 260 y 280 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000 (Eppendorf).

El cociente de los valores de densidad óptica obtenidos a 260 y a 280 nm (D.O.260/D.O.280), se utiliza para determinar la pureza de la muestra o grado de

contaminación proteica, considerando como valores adecuados una relación entre 1.65 y 2.0. En el caso de obtener valores inferiores, que indican contaminación por proteínas o por solventes orgánicos, se realizó una nueva purificación del ADN. Los valores superiores indican un exceso de ARN, que se eliminó tratando la solución de ADN con RNAsa y purificando nuevamente según el método antes descrito.

La muestra de ADN con una concentración aproximada entre 1,000 y 1,500 µg/mL, se almacenó en tubos Eppendorf® a -20°C, con el fin de evitar tanto la degradación progresiva del ADN como su posible contaminación por microorganismos.

### 3.6 GENOTIPADO DE LAS MUESTRAS:

Se genotiparon diferentes genes de diversas enzimas, mediante diferentes técnicas:

3.6.1 Genotipado mediante PCR Multiplex de los genes de *GSTT1* y *GSTM1*.

3.6.2 Para el genotipado de los polimorfismos SNPs rs662, rs17655, rs1805087 y rs1800566 en los genes codificantes para las enzimas PON1, ERCC5, MTR y NQO1 respectivamente se dispone de sondas comerciales TaqMan de Applied Biosystems.

3.6.3 En el caso de *EPHX1* rs1051740, se empleó la tecnología Amplifluor.

#### **3.6.1 Genotipado con PCR Multiplex del polimorfismo *GSTT1* y *GSTM1*:**

La técnica de elección para detección de polimorfismos genéticos de las Glutación Transferasas, que son polimorfismos de presencia (Plus) o ausencia (Null), se ha realizado mediante una novedosa técnica de PCR-Multiplex. Nuestro objetivo es realizar una técnica PCR-Multiplex con dos parejas de primers para la detección de dos polimorfismos diferentes de una misma enzima.

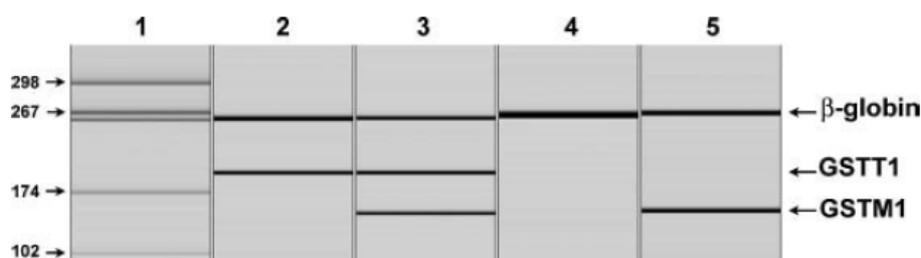
Consiste en combinar en una única reacción todos los pares de cebadores de los sistemas que queremos amplificar simultáneamente. Las ventajas son que se obtiene la información de varios loci en una sola reacción, se necesita menor cantidad de molde para el análisis, menor cantidad de reactivos, rápida construcción de base dada. Por tanto, el genotipado de los polimorfismos estudiados de *GSTT1* y *GSTM1*, se realiza

mediante esta novedosa técnica Multiplex, que incluye un control interno de amplificación de un fragmento de un gen endógeno como la Beta-globina.

Los loci genómicos de *GSTT1*, *GSTM1* y *Beta-globina* fueron amplificados partiendo de 100 ng de ADN en un volumen total de 1 ml con una concentración de 3,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs, 0.5 U de Taq- polimerasa y 2 pmol de cada uno de los primers:

- *GSTT1*-fw (ATCTGTGGTCCCCAAATCAG),
- *GSTT1*-rv (TTGGCCTTCAGAATGACCTC),
- *GSTM1*-fw (CTC CAT AAC ACG TGA AGC AAA AC),
- *GSTM1*-rv (CAG GAG AAA CTG AAG CCA AAG T),
- *Beta-globin*-fw (GAAGAGCCAAGGCAGTTACGG)
- *Beta-globin*-rv (CAACTTCATCCACGTTACCTT).

Para el diseño de los primers del *GSTT1* empleamos el programa primer3 ([www.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://www.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). El tamaño de los amplicones fue de 205 bp para *GSTT1*, 156 bp para *GSTM1* y 268 bp para *Beta-globina*. Los genotipos nulos fueron evidenciados por la ausencia de los amplicones de *GSTT1* y/o *GSTM1* y observando la presencia de amplificación de beta-globina usada como control interno.



**Fig. 35.** Resultados de electroforesis capilar de alta resolución.

Fuente: Elaboración propia

Los reactivos MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Go Taq Flexi polimerasa y Go Taq buffer fueron obtenidos de Promega. El protocolo de PCR en el termociclador fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 2'.

- Paso de alineamiento 1, 10 ciclos:
  - Desnaturalización a 94°C 15",
  - Anillamiento y extensión 58°C 15",
  - 72°C 20",
- Paso de alineamiento 2, 24 ciclos:
  - Desnaturalización 94°C 15",
  - Anillamiento y extensión 61°C 15"
  - 72°C 20",
- Paso de extensión final de 3 minutos a 72°C.

Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante electroforesis con viabilidad comparable utilizando ya sea gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% o bien el equipo QiAxcell de separación en matriz de ADN de alta resolución (cat 929 002) de QiAxcell (Qiagen, Hilden, Alemania) que consiste en electroforesis en gel mediante sistema multicapilar de alta resolución.

### **3.6.2 Genotipado de las muestras mediante sondas Taqman.**

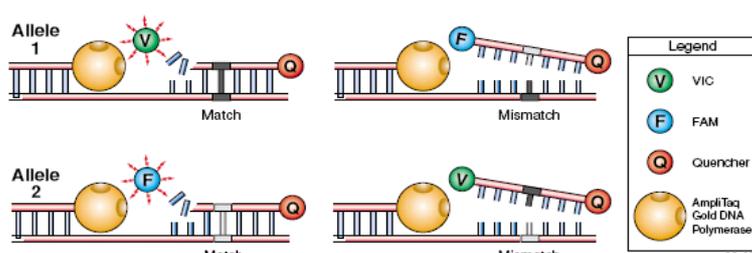
El genotipado de los polimorfismos de los genes *PON1*, *ERCC5*, *MTR* y *NQO1* fue realizado mediante discriminación alélica mediante sondas comerciales TaqMan de Applied Biosystems. Estas sondas están validadas y separan las muestras en tres grupos (homocigotos para un alelo, homocigotos para el otro alelo y heterocigotos). Para ello usamos un termociclador 7500 Fast mediante PCR-RT de Applied Biosystems (Foster City, CA).

El análisis de fluorescencia mediante sondas TaqMan se basa en primers específicos de alelo que contienen dos tipos de moléculas fluorescentes (fluorocromos) según el alelo y un "apantallador" o "quencher" de esta fluorescencia. La sonda Taqman es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa. Esta sonda presenta un fluorocromo unido en el extremo 5' ó reporter (FAM, o VIC) y otro unido en el extremo 3' ó quencher (NFQ).

Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el reporter es absorbida por el quencher mediante un proceso conocido como FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente); que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Didenko VV,2001).

Si la secuencia de DNA complementaria a la sonda está presente, se produce la unión entre ambos. Cuando la polimerasa inicia el proceso de copiado desde el extremo 3' del cebador degrada las sondas gracias a su actividad 5' exonucleasa. Esta degradación hace que el reporter y el quencher se separen, produciéndose un incremento en la fluorescencia que es recogido y almacenado por el secuenciador.

La separación de la sonda del ADN posibilita que el proceso de extensión del primer continúe hasta el final. Este proceso se repite en cada ciclo, dando lugar a un incremento en la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de producto generado. Así, se diseña una sonda Taqman con la secuencia que correspondería al alelo 1 unido a un fluorocromo (FAM o VIC), y otra sonda con la secuencia que correspondería al alelo 2 (FAM o VIC). Cada sonda se unirá de manera específica a su secuencia complementaria, y al unirse será cuando la polimerasa separe el reporter del quencher y la fluorescencia que se emite será específica de la secuencia a la que era complementaria.



Funcionamiento de una sonda TaqMan: cada sonda está unida específicamente a un fluorocromo diferente, al ejercer su acción la polimerasa permite la liberación del fluorocromo y se produce emisión de fluorescencia

**Fig. 36.** Mecanismo de acción de Sondas TaqMan.  
Fuente: Applied Biosystems

Para realizar la amplificación del fragmento de ADN de interés para cada polimorfismo mediante la reacción en cadena de la polimerasa se prepara una mezcla con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), que contiene AmpliTaq

Gold ADN Polimerasa, dNTPs con dUTP, más las sondas específica del gen, agua destilada y ADN. Las concentraciones y volúmenes específicos de cada reactivo se resumen en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Composición de la mezcla de PCR.

Reactivo	Concentración	Vol/muestra
2X TaqMan PCR Master Mix	1X	12.5
20X SNP Genotyping Assay	1X	1.25
ADN	10ng/ul	11.25

Fuente: Elaboración propia

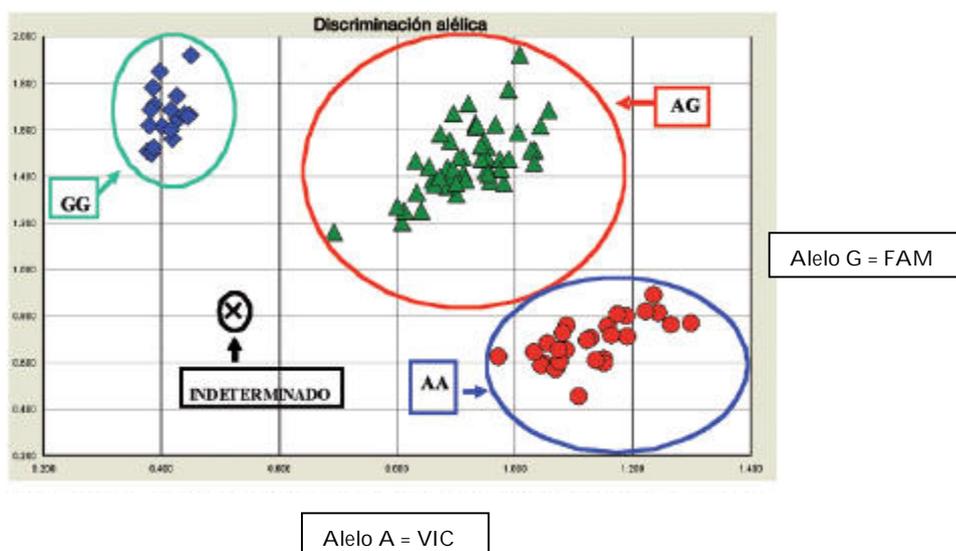
Las reacciones se llevan a cabo en una placa de 96 pocillos (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems). Una vez cargada toda la placa se cubre con un adhesivo y se coloca en el bloque térmico del sistema de detección Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR. Las condiciones para la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa para todos los polimorfismos son las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos.
- Paso de alineamiento 40 ciclos:
  - Desnaturalización a 95°C 15 segundos.
  - Anillamiento y extensión a 60°C 1 minuto.
- Disociación.
  - 95°C durante 15 segundos.
  - 55°C durante 1 minuto.
- Incrementos lentos de temperatura hasta 95°C.

Tras la amplificación se procede a la discriminación alélica, empleándose el software del sistema de detección 7500HT Fast Real-Time PCR que clasifica las muestras según la fluorescencia. En la figura (**Fig. 37**), se representa la intensidad de señal emitida por cada fluorocromo que estará asociado a un alelo diferente. En el eje X representa corresponde la intensidad de señal del fluorocromo VIC asociado al alelo

A; y en el eje Y la señal del fluorocromo FAM asociado al alelo G. Dependiendo de la intensidad de cada uno de ellos se clasificarán las muestras como:

- Homocigoto alelo A: si solo existe fluorescencia VIC;
- Homocigoto alelo G: si solo existe fluorescencia FAM;
- Heterocigoto (alelo X e Y): si existen ambas fluorescencias VIC y FAM



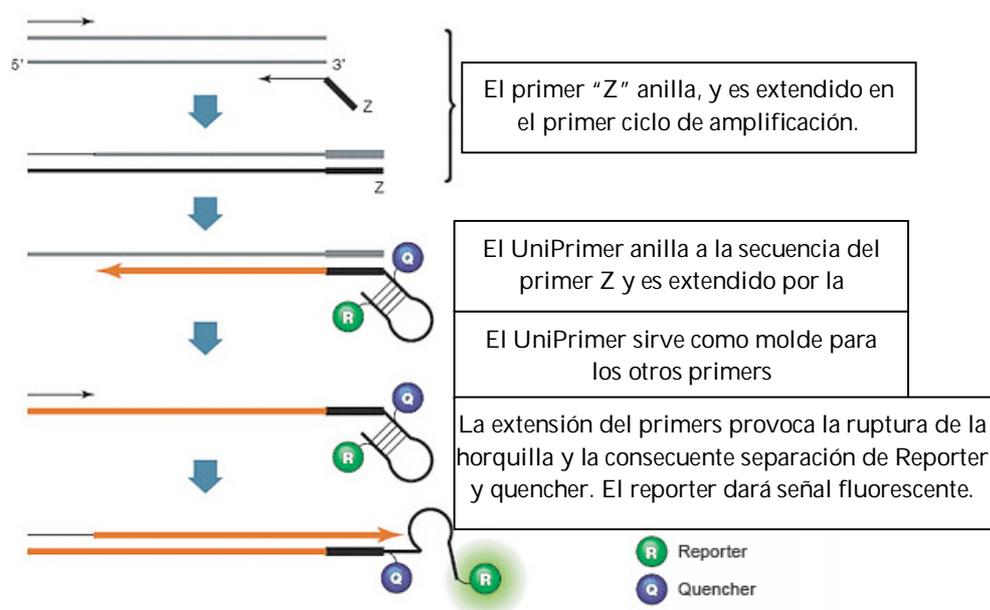
**Fig. 37.** Representación cartesiana de los resultados de PCR.  
Fuente: Modificado Applied Biosystems

El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de estas sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales. Los productos de PCR fueron confirmados por secuenciación directa utilizando ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos de NCBI mediante la aplicación Blast <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

### 3.6.3 Genotipado *EPHX1* rs1051740 mediante técnica Amplifluor.

Para el polimorfismo de *EPHX1* rs1051740 se emplea la tecnología Amplifluor. Esta estrategia se basa en la utilización de Sondas Amplifluor, que son cebadores específicos de alelo con una secuencia consenso a la que se hibridarán posteriormente los fluorocromos FAM y JOE.

Este sistema consta de dos pasos realizados en la misma reacción de PCR: uno de los primers específicos lleva una secuencia universal (llamada "secuencia Z") en el extremo 5', por lo que durante la amplificación la secuencia Z se añade al amplicón (**Fig. 38**). A continuación se utiliza un segundo primer (llamado "Uniprimer") complementario de la secuencia Z y que incorpora una horquilla en su extremo 5' con un fluoróforo (FAM o JOE) y un quencher. Esta horquilla se incorpora al producto de PCR cuando se produce la extensión del "Uniprimer", de tal forma que cuando este nuevo producto de PCR se convierte en molde durante el siguiente ciclo de amplificación, la Taq-Polimerasa abre la horquilla, y provoca su linealidad, lo que separa el fluoróforo y el quencher que se encontraban próximos en la estructura inicial, observándose un incremento de la fluorescencia fácilmente detectable.



**Fig. 38.** Mecanismo de acción de Sondas Amplifluor.

Fuente: Modificado de Applied Biosystems

El diseño de cebadores se hace gracias a la aplicación informática <https://apps.serologicals.com/AAA/design/inputSequences.aspx?reset=true>. L

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

- rs1051740C: GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCAGGTGGAGATTCTCAACAGAC

- rs1051740T: GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAGGTGGAGATTCTCAACAGAT

- rs1051740R: CTCTCTGGCTGGCGTTT

La composición de la mezcla para la PCR con sondas Amplifluor se indica en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Composición mezcla PCR.

Reactivo	Concentración	Vol/muestra (μl)
H2O		3.30
Amplifluor FAM	20X	0.25
Amplifluor JOE	20X	0.25
Primer mix-3	20X	0.25
Reaction mix S	10X	0.50
dNTPs	2.5mM x cada uno	0.40
Taq polimerasa		0.05
Total		5ul

Fuente: Elaboración propia

Las condiciones del programa de PCR para la amplificación para este polimorfismo son las siguientes:

- Desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos.
- Paso de alineamiento 1, 20 ciclos:
  - Desnaturalización a 96°C 15 segundos,
  - Anillamiento 62°C 5 segundos,
  - Extensión 72°C 10 minutos,
- Paso de alineamiento 2, 24 ciclos a:
  - Desnaturalización 96°C 15 segundos,
  - Anillamiento 56°C 20 segundos,

- Extensión 72°C 40 segundos,
- Paso de elongación final a 3 minutos 72°C.

La amplificación se lleva a cabo en el equipo de PCR Applied Biosystems 700HT Fast Real-Time PCR; en placas de 6 pocillos (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate, Applied Biosystems). Los resultados obtenidos tras la amplificación se analizan en el software 7500HT Fast Real-Time PCR que clasifica las muestras según la fluorescencia del mismo modo que se llevaba a cabo para las sondas Taqman.

### **Análisis de los cambios estructurales de las proteínas:**

El análisis de las posibles consecuencias estructurales ocasionadas por las variantes genotípicas que conllevan cambio de aa está respaldado por análisis de función de cálculo como el SIFT (Kumar P, et al 2009. SIFT se puede aplicar a los polimorfismos de origen natural. Dicho programa predice la consecuencia del cambio de aminoácido, y realiza una predicción intolerante o no, conllevando un cambio estructural importante que determinara la funcionalidad de la proteína/enzima que codifique.

También se ha consultado el programa conocido como PolyPhen *Polymorphism Phenotyping* (=polimorfismo fenotipificación v2) (PolyPhen, 2004). Es una herramienta que predice el posible impacto de una sustitución de aminoácidos en la estructura y función de una proteína humana utilizando sencillas consideraciones físicas y comparativas.

### 3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN EL ESTUDIO:

Se llevó a cabo un análisis estadístico comparando la distribución de los diferentes polimorfismos entre el grupo de controles y los distintos grupos de pacientes en función de sus características clínicas, con el fin de determinar una posible asociación entre ellos, aunque previamente se hizo un estudio del tamaño muestral.

-Tamaños muestral:

El tamaño de la muestra alcanzado en nuestra serie fue óptimo de acuerdo con la estimación para estudios de un solo gen obtenida con el programa Quanto (v.1.2, Universidad de California) (Gauderman WJ, 2002), basado en estudios previos similares para estimar OR (Infante-Rivard C, et al. 2007).

- Pruebas diagnosticas usadas:

El test usado para poder comparar las medias entre casos y controles fue la "t" de Student, mediante el programa informático SPSS versión 15.0 (Chicago, IL). El análisis estadístico se llevó a cabo con el fin de evaluar si existen diferencias significativas en la distribución de genotipos comparando los diferentes grupos. Se aplicó la prueba exacta de Fisher y la "Chi cuadrado" de Pearson. Para ello se usó el programa Epidat v 3.1 (Junta de Galicia, Coruña, España: Pan American Health Organization (WHO), Washington DC, USA; 2005).

- Comparación de frecuencias Alélicas y Genotípicas:

Con objeto de estudiar estas frecuencias se recurrió al estudio de desequilibrio de ligamiento según Hardy-Weinberg (HW). Es una pieza clave en los estudios de asociación entre mutaciones genéticas y enfermedades. En estudios de casos y controles, los controles tienen como función representar a la población general; por lo tanto, la muestra de controles debe estar en equilibrio de HW, mientras que el desequilibrio de HW en los casos sugiere una asociación entre la mutación y la enfermedad (Balding DJ, 2006). Para el estudio del desequilibrio de ligamiento según Hardy-Weinberg, el análisis de los efectos conjuntos de los polimorfismos estudiados se realizaron con el programa Shesis-Page (<http://analysis2.bio-x.cn/myAnalysis.php>) (Li Z, et al. 2009).

- Aplicación de diferentes modelos de herencia.- Modelo codominante:

Usamos el modelo de herencia codominante, que es el modelo de herencia más general. En él los dos alelos diferentes están presentes en un genotipo y ambos son expresados. Es decir, ningún alelo es dominante o recesivo donde cada genotipo proporciona un riesgo de enfermedad diferente y no aditivo. Se dice también que es un

estado en que un gen expresa su característica en el heterocigoto de modo equivalente a su par. Los alelos del gen se expresan al mismo tiempo dando origen a un fenotipo determinado que presenta ambas características.

# RESULTADOS



#### 4. RESULTADOS

La exposición de los resultados se ha realizado agrupando los polimorfismos genéticos estudiados según la función de las enzimas codificadas por los correspondientes genes. De manera que se establecieron dos categorías: enzimas de metabolización y enzimas de reparación y/o síntesis;

- Enzimas de metabolización de tóxicos, subdivididas en dos bloques:

- Metabolización por enzimas **GSTs**
- Metabolización por enzimas **EPHX1, NQO1 y PON1**.

- Enzimas de reparación y/o de síntesis de ADN:

- Enzimas de reparación **ERCC5, XPA**
- Enzimas de síntesis **MTR**

##### 4.1 RESULTADOS DEL SNP GSTT1 Y GSTM1:

El análisis de los datos demográficos de las poblaciones de casos y controles, así como la tasa de respuesta al cuestionario se presenta en la **tabla 9**:

**Tabla 9.** Resultados demográficos de los SNP GSTT1 y GSTM1.

	n	Respuesta Cuest (%)	Edad (SD)	Mujeres n (%)	Fumador n (%)	Exp Resid. n (%)	Exp Ocupat. n (%)
<b>Casos</b>	158	64.5	52.5(15.6)	81 (51.3)	48/102 (47.1)	47/158 (29.7)	23/102 (22.5)
<b>Control</b>	214	78.5	54.0 (8.4)	114 (53.3)	68/168 (40.5)	47/214 (22.0)	27/168 (16.1)
<b>P</b>			0.234	0.702	0.289	0.087	0.184
<b>Total</b>	372	72.6	53.5 (5.6)	195	116/270	94/372	51/283

Fuente: Elaboración propia

\*El ochenta y cinco por ciento de la población de estudio no había cambiado su estado de exposición residencial en los últimos 20 años.

La evaluación de la posible diferencia entre las dos poblaciones de casos y controles es un paso previo y necesario para que se pueda cumplir el criterio de emparejamiento y evitar los sesgos de confusión más comunes en los estudios de casos y controles. En nuestro caso no se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles en cuanto a edad, sexo, y tipo de exposición.

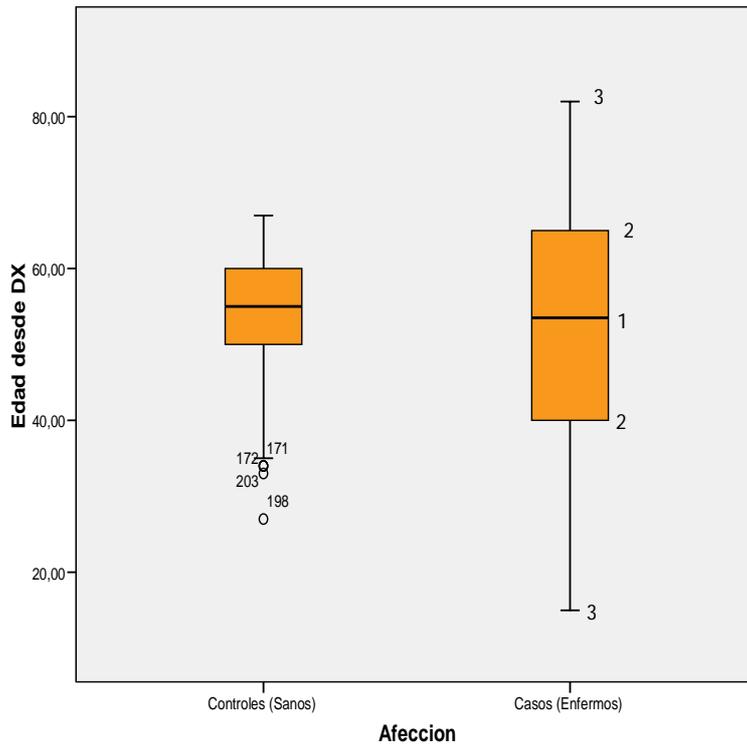
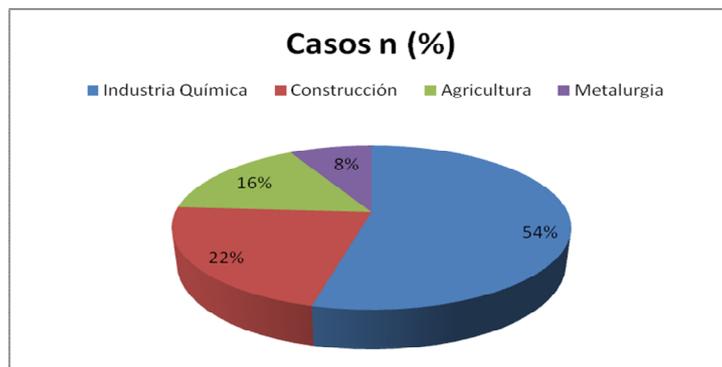


Diagrama Box-Plot o de caja de los datos divididos en cuartiles de casos frente a controles, en el se representan las medias (1), las desviaciones estándar (2), así como los valores máximos y mínimos (3).

**Fig. 39.** Diagrama Box-Plot del SNP GSTT1 y GSTM1  
Fuente: Modificado de SPSS v.15

El cuestionario también permitió conocer cómo es la distribución de casos en cuanto a su actividad ocupacional. (**Fig. 40**)



**Fig. 40.** Porcentajes de tipo de ocupación profesional en la población de casos.  
Fuente: Elaboración propia

El genotipado se realizó con éxito en todos los sujetos de estudio. En la **tabla 10** se

muestran los resultados globales tras genotipar casos y controles.

**Tabla 10.** Resultados del genotipado *GSTM1* y *GSTT1*

	<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1</i>	
	Null	Plus	Null	Plus
Casos	40 (25.3)	118 (74.7)	71 (44.9)	87 (55.1)
Controles	33 (15.4)	181 (84.6)	119 (55.6)	95 (44.4)
P (OR; 95%CI)	0.018 (1.86; 1.11–3.11)		0.042 (0.65; 0.43–0.99)	

Fuente: Elaboración propia

En el análisis del polimorfismo *GSTM1* en ambos grupos, no observamos diferencias significativas entre casos y controles; aunque hay una ligera mayor frecuencia de casos con genotipo *GSTM1* "Plus" con que en los controles (P= 0.042). Sin embargo, para el polimorfismo *GSTT1*, la frecuencia del genotipo null fue mayor en los pacientes que en los controles 25,3% vs 15,4%, respectivamente (p = 0,018; OR: 1,86, IC 95%: 1.11 a 3.11).

En búsqueda de diferencias en la presencia de cada SNP con respecto a la población global se analizaron ambos grupos; no existiendo diferencia entre la presencia de los genotipos *GSTT1* y *GSTM1* con respecto a la población total. En el caso del genotipos *GSTT1* no se observó diferencia significativa, con un valor de P= 0,478.

**Tabla 11.** Resultados del genotipado *GSTT1* plus vs población total.

	Casos	Controles	Total
Población total	158 (42.5)	214 (57.5)	372
<i>GSTT1</i> plus	118 (39.5)	181 (60.5)	299

Fuente: Elaboración propia

Para el caso del genotipo *GSTM1*, ocurrió de manera similar, no se observa diferencia significativa, valor de P=0,2735.

**Tabla 12.** Resultados del genotipado *GSTM1* plus

	Casos	Controles	Total
Población total	158 (42.5)	214 (57.5)	372
<i>GSTM1</i> plus	87 (48)	95(52)	182

Fuente: Elaboración propia

- **Análisis del SNP según grupos poblacionales y tipos de exposición:**

Posteriormente al análisis de la población en general se hizo un estudio pormenorizado de cada polimorfismo por grupos poblacionales y tipos de exposición.

**Tabla 13.** Resultados SPN *GSTM1* y *GSTT1* vs. grupos poblacionales.

	<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1</i>	
	Null	Plus	Null	Plus
<b>Mujeres</b>				
Casos	22 ( <b>27.2</b> )	59 (72.8)	39 (48.1)	42 (51.9)
Controles	16 ( <b>14.0</b> )	98 (86.0)	64 (56.1)	50 (43.9)
P (OR; 95%CI)	<b>0.019</b> (2.28; 1.11–4.69)		0.170 (0.72; 0.41–1.28)	
<b>Hombres</b>				
Casos	18 (23.4)	59 (76.6)	32 (41.6)	45 (58.4)
Controles	17 (17.0)	83 (83.0)	55 (55.0)	45 (45.0)
P (OR; 95%CI)	0.193 (1.49; 0.71–3.12)		0.076 (0.58; 0.32–1.06)	
<b>Fumador</b>				
Casos	10 (20.4)	39 (79.6)	22 (44.9)	27 (55.1)
Controles	12 (17.6)	56 (82.4)	37 (54.4)	31 (45.6)
P (OR; 95%CI)	0.442 (1.19; 0.47–3.04)		0.204 (0.68; 0.32–1.42)	
<b>Exp Resident</b>				
Casos	15 (31.9)	32 (68.1)	19 (40.4)	28 (59.6)
Controles	9 (19.1)	38 (80.9)	26 (55.3)	21 (44.7)
P (OR; 95%CI)	0.118 (1.98; 0.76–5.12)		0.108 (0.54; 0.24–1.24)	
<b>Exp Ocupac</b>				
Casos	6 (26.1)	17 (73.9)	11 (47.8)	12 (52.2)
Controles	7 (25.9)	20 (74.1)	16 (59.3)	11 (40.7)
P (OR; 95%CI)	0.62 (1.00; 0.28–3.58)		0.300 (0.63; 0.18–1.78)	

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la tabla anterior, la diferencia que se encontró en población general para el genotipo *GSTT1* es más pronunciada en el grupo de casos de género

femenino 27,2% frente al grupo control del mismo género 14,0%, con un valor de significación de  $P = 0,019$ ; (OR: 2,28, IC del 95%: 1,11 a 4,69). Esta diferencia no se observó cuando hacemos la selección por sexo masculino. En general, no se observa asociación relevante entre casos y controles para los diferentes tipos de exposición para ninguno de los dos polimorfismos de GSTs.

- **Evaluación del SNP con los diferentes tipos de linfoma:**

Se evaluó el papel de estos genotipos restringiendo el análisis según tipo de linfoma, comparando los diferentes grupos con respecto a los controles. Primero analizamos el grupo de controles frente al grupo de LNH, por ser este el más numeroso y englobar los a la mayoría de los tipos de linfomas. Observamos que el genotipo *GSTT1* null es más frecuente en casos con LNH (23,9%) que en controles (15,4%), siendo su grado de significación ( $P=0.033$ ; OR = 1.72; 95%CI: 1.01–2.94), y observamos que este % es mayor en mujeres (77,3%) que en varones (75%).

**Tabla 14.** Resultados del genotipado SNP *GSTM1* y *GSTT1* vs. LNH.

		<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1</i>	
		<i>Plus</i>	<i>Null</i>	<i>Plus</i>	<i>Null</i>
LNH	Controles	181 (84.6)	33 ( <b>15.4</b> )	95 (44.4)	119 (55.6)
	Casos	105 (76.1)	33 ( <b>23.9</b> )	75 (54.3)	63 (45.7)
	P (OR; 95%CI)	0.033 (1.72; 1.01- 2.94)		0.043 (0.67; 0.44-1.03)	
	♂	18 (25%)	54 ( <b>75%</b> )	37 ( <b>51.4%</b> )	35 (48.6%)
	♀	15 (22.7%)	51 ( <b>77.3%</b> )	26 ( <b>39.4%</b> )	40 (60.6%)

Fuente: Elaboración propia

Para el genotipo en *GSTM1* tampoco observamos diferencia significativa al comparar el grupo control frente al grupo de pacientes con LNH. Sí hay que resaltar la mayor presencia de *GSTM1 plus* en varones (51,4 %), siendo esta considerablemente mayor que en mujeres (39,4%), a diferencia de lo que ocurre en *GSTT*.

Posteriormente se analizó el papel de los distintos grupos de linfomas y los controles.

**Tabla 15.** Resultados del genotipado SNP GSTM1 y GSTT1 vs tipos de Linfomas

	<i>GSTT1</i>		<i>GSTM1</i>	
	<i>Plus</i>	<i>Null</i>	<i>Plus</i>	<i>Null</i>
Controles	181 (84.6)	33 (15.4)	95 (44.4)	119 (55.6)
<b>BCL</b>	118 (74.7)	40 (25.3)	87 (55.1)	71 (44.9)
p (OR; 95% CI)	<b>0.013</b> (1.85; 1.11-3.09)		0.027 (0.65; 0.43-0.99)	
<b>LNH</b>	105 (76.1)	33 (23.9)	75 (54.3)	63 (45.7)
p (OR; 95% CI)	<b>0.033</b> (1.72; 1.01- 2.94)		0.043 (0.67; 0.44-1.03)	
<b>LH</b>	13 (65.0)	7 (35.0)	12 (60.0)	8 (40.0)
p (OR; 95% CI)	<b>0.035</b> (3.0; 1.15-7.91)		0.135 (0.543; 0.22-1.35)	
<b>LF</b>	71 (78.0)	20 (22.0)	55 (60.4)	36 ( <b>39.6</b> )
p (OR; 95% CI)	0.113 (1.55; 0.84-2.78)		<b>0.007</b> (0.53; 0.32-0.86)	
<b>LBDCL</b>	23(88.5)	3 (11.5)	12 (46.2)	14 (53.8)
p (OR; 95% CI)	0.429 (0.81; 0.25-2.63)		0.513 (0.93; 0.92-2.07)	

Fuente: Elaboración propia

No se observa diferencia significativa entre grupos de pacientes con LF y LBDCL y controles para el genotipo *GSTT1*, pero sí para los pacientes con LH. En cuanto al polimorfismo *GSTM1* vemos como el genotipo nulo es más frecuente en pacientes con LF que en los controles (39.6% vs 55.6%: P =0.007; OR =0.53, CI: 0.32–0.86). No se observaron diferencias significativas para el resto de comparaciones en dicho polimorfismo.

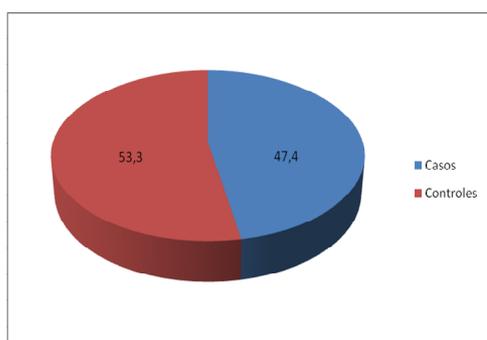
#### 4.2 RESULTADOS DE LOS SNP DE ENZIMAS DE METABOLIZACIÓN.

Las tres enzimas EPHX1, NQO1 y PON1, juegan un papel en la detoxificación de compuestos potencialmente carcinógenos procedentes de la industria química/agrícola o de compuestos endógenos. Los datos demográficos de ambas poblaciones se muestran en la **tabla 16** que se muestra a continuación (**Fig. 42**). El análisis no muestra diferencias significativas entre pacientes y controles en cuanto a edad y sexo. (**Fig. 41**)

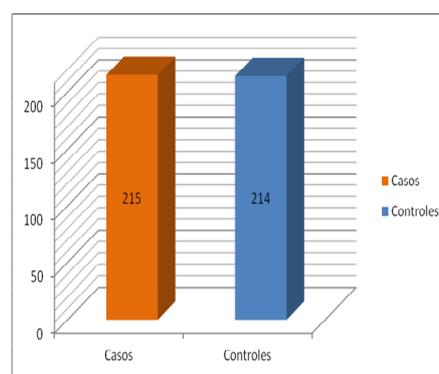
**Tabla 16.** Resultados de demográficos de EPHX1, NQO1 y PON1

	n	Edad x (SD)	♀ n (%)
Casos	215	53.8 (15.2)	102 (47.4)
Controles	214	53.9 (8.4)	114 (53.3)
p		0.933	0.227
Total	429	53.8 (12.8)	216 (50.3)

Fuente: Elaboración propia

**Fig. 41.** Gráfico de sectores de % de mujeres en las poblaciones de casos y controles.

Fuente: Elaboración propia

**Fig. 42.** Histograma de barras de la distribución de la población en casos y controles

Fuente: Elaboración propia

El genotipado de casos y controles fue realizado a casi todos los sujetos del estudio, a excepción de 9 casos para el genotipo *EPHX* y dos para *NQO1* que no pudieron genotiparse con éxito. La distribución de genotipo fue consistente con la ley de Hardy-Weinberg ( $p=0.187$ ,  $0.892$  y  $0.228$ ; respectivamente). Los resultados para las frecuencias genotípicas fueron similares a las dadas por HapMap-CEU para individuos europeos:

- *EPHX1*: TT 54.8%, TC 36.7%, CC 8.5%.
- *NQO1*: CC 59.5%, CT 35.0%, TT 5.4%.
- *PON1*: AA 42.7%, AG 47.3%, GG 10.0%.

- **Análisis de la población total:**

La siguiente tabla (**tabla 17**) muestra los resultados de los tres polimorfismos:

**Tabla 17.** Resultados del genotipado EPHX1, NQO1 y PON1

		<b>EPHX (rs1051740)</b>			<b>NQO1(rs1800566)</b>			<b>PON1(rs662)</b>		
		TT	CT	CC	CC	CT	TT	AA	AG	GG
<b>Total</b>	Casos	118 (57.3)	71 (34.5)	17 (8.2)	131 (61.5)	72 (33.8)	10 (4.7)	83 (38.6)	99 (46.0)	33 ( <b>15.3</b> )
	Controles	113 (52.8)	83 (38.8)	18 (8.4)	123 (57.5)	78 (36.4)	13 (6.0)	100 (46.7)	104 (48.6)	10 (4.7)
p (OR; 95% CI)		0.953 (1.0;0.5-2.0)			0.677 (0.8;0.3-1.8)			<b>0.0004</b> (3.7;1.8-7.7)		
♀	Casos	57 (58.2)	36 (36.7)	5 (5.1)	63 (61.2)	34 (33.0)	6 (5.8)	42 (41.2)	47 (46.1)	13 (12.7)
	Controles	61 (53.5)	44 (38.6)	9 (7.9)	64 (56.1)	42 (36.8)	8 (7.0)	59 (51.8)	50 (43.9)	5 (4.4)
p (OR; 95% CI)		0.590 (0.6;0.2-1.9)			0.936 (0.8;0.3-2.4)			0.05 (3.2;1.1-9.3)		
♂	Casos	61 (56.5)	34 (31.5)	13(12.0)	68 (61.8)	38 (35.4)	4 (3.6)	41 (36.6)	52 (46.0)	20 (17.7)
	Controles	52 (52.0)	39 (39.0)	9 (9.0)	59 (59.0)	36 (36.0)	5 (5.0)	41 (41.0)	54 (54.0)	5 (5.0)
P (OR; 95% CI)		0.627 (1.4;0.6-3.4)			0.884 (0.7;0.2-2.7)			<b>0.008</b> (4.1;1.5-11.3)		

Fuente: Elaboración propia

No se observamos diferencias significativas para los polimorfismos *NQO1* y *EPHX* respectivamente. Al contrario si observamos una asociación significativa del genotipo GG del polimorfismo del gen *PON1* con un posible desarrollo de linfoma, (15.3% vs. 4.7%; OR = 3.7 CI (95%): 1.8-7.7;  $p < 0.001$ ). Dicha asociación se observa principalmente con el género masculino ( $p = 0,008$ ) pero no con el femenino ( $p = 0,05$ ).

Este mismo hallazgo se confirma cuando se realiza la distribución alélica del polimorfismo *PON1*; G: 165 (38.4%) en casos vs. 124 (29.0%) en controles;  $p=0.0045$ . (**Tabla 18**).

**Tabla 18.** Resultados de distribución alélica PON1

rs662	A	G
Controles	304 (71%)	124 (29%)
Casos	269 (57.6%)	165 (38.4%)
P	<b>0,0049</b>	
OR (95% CI)	1,503777; (1,130955-1,999501)	

Fuente: Elaboración propia

- **Resultados según el tipo de exposición:**

En el análisis según los diferentes tipos de exposición; al observar los resultados según exposición por residencia, el 19,1% de los casos eran portadores GG mientras que ningún control mostró este genotipo ( $p = 0,005$ ). También se observaron diferencias estadísticamente significativas para el genotipo GG entre casos y controles sin exposición ocupacional (14,1% vs 2,8%,  $p = 0,004$ , OR (IC del 95%) 5,6; 1,7 a 18,3).

**Tabla 19.** Resultados de genotipado EPHX1, NQO1 y PON1 vs grupos poblacionales.

		EPHX1(rs1051740)			NQO1(rs1800566)			PON1(rs662)		
		TT	CT	CC	CC	CT	TT	AA	AG	GG
Fumador	Casos	27 (56.3)	18 (38.5)	3 (6.3)	30 (64.7)	16 (33.3)	2 (4.2)	21 (43.8)	21 (43.8)	6 (12.5)
	Controles	29 (42.6)	32 (47.1)	7 (10.3)	44 (64.7)	23 (33.8)	1 (1.5)	35 (51.5)	31 (45.6)	2 (2.9)
	p (OR;95%)	0.668 (0.6;0.1-2.4)			0.759 (2.9;0.3-33.1)			0.10 (4.7;0.9-24.5)		
No Fumador	Casos	32 (60.4)	17 (32.1)	4 (7.5)	34 (64.2)	17 (32.1)	2 (3.8)	26 (49.1)	20 (37.7)	7 (13.2)
	Controles	58 (58.0)	34 (34.0)	8 (8.0)	57 (57.0)	36 (36.0)	7 (7.0)	47 (47.0)	49 (49.0)	4 (4.0)
	p (OR;95%)	0.828 (0.9;0.3-3.3)			0.656 (0.5;0.1-2.6)			0.077 (3.7;1.0-13.1)		
Resid. exp	Casos	25 (53.2)	20 (42.6)	2 (4.3)	31 (66.0)	14 (29.8)	2 (4.3)	15 (31.9)	23 (48.9)	9 (19.1)
	Controles	20 (42.6)	22 (46.8)	5 (10.6)	25 (53.2)	19 (40.4)	3 (6.4)	26 (55.3)	21 (44.7)	0
	p (OR;95%)	0.432 (0.4;0.1-2.0)			1.0 (0.7;0.1-4.1)			<b>0.005 (NA)</b>		
No Resid exp	Casos	65 (58.6)	37 (33.3)	9 (8.1)	69 (62.2)	37 (33.3)	5 (4.5)	57 (51.4)	44 (39.6)	10 (9.0)
	Controles	93 (55.7)	61 (36.5)	13 (7.8)	98 (58.7)	59 (35.3)	10 (6.0)	74 (44.3)	83 (49.7)	10 (6.0)
	p (OR;95%)	0.897 (1.0;0.4-2.5)			0.791 (0.7;0.2-2.2)			0.473 (1.6; 0.6-3.9)		
Occpac. exp	Cases	13 (56.5)	8 (34.8)	2 (8.7)	13 (56.2)	9 (39.1)	1 (4.7)	14 (59.3)	7 (33.3)	2 (7.4)
	Controls	16 (59.3)	7 (25.9)	4 (14.8)	15 (55.6)	12 (44.4)	0	13 (48.1)	11 (40.7)	3 (11.1)
	p (OR;95%)	0.820 (0.5;0.1-3.3)			0.935 (NA)			0.850 (0.8;0.1-5.0)		
No Occupac. exp	Cases	46 (59.0)	27 (34.6)	5 (6.4)	50 (64.1)	25 (32.1)	3 (3.8)	35 (44.9)	32 (41.0)	11 (14.1)
	Controls	71 (50.4)	59 (41.8)	11 (7.8)	86 (61.0)	47 (33.3)	8 (5.7)	66 (46.8)	71 (50.4)	4 (2.8)
	p (OR;95%CI)	0.705 (0.8;0.3-2.4)			0.787 (0.7;0.2-2.6)			<b>0.004 (5.6;1.7-18.3)</b>		

Fuente: Elaboración propia

Un hallazgo similar se observó para la distribución alélica al comparar controles frente a casos expuestos por residencia, alelo G: 41 (43,6%) vs. 21 (22,3%) ,  $p = 0,002$ ; OR = 2,7 (IC del 95%): 01.4 a 05.01). Curiosamente, cuando se compararon los casos con y sin exposición residencial, el alelo G se encuentra más asociado con los casos expuestos que en los casos no expuestos (41/94, 43,6% frente a 64/222, 28,8%,  $p = 0,016$ ,

OR = 1.9 IC (95%): 1.2 a 3.2), mientras que esta diferencia no se observó en los controles (21/94, 12,8% frente a 103/334, 30,8%,  $p = 0,140$ ).

**Tabla 20.** Resultados alelos PON1 vs grupos exposición residencial.

		PON1 (rs662)	
		A	G
Total	Controles	304	124
	Casos	269	165
	P	0,0049	
	OR (95% CI)	1,5 1,130955 1,999501	
Exp. Residencial	Controles	73 (77,7%)	21 (22,3%)
	Casos	53 (56,4%)	41 (43,6%)
	P	0,002	
	OR (95% CI)	2,7 (1,43- 5,01)	
No Exp Residencia	Controles	231	103
	Casos	158	64
	p	0,016	
	OR (95% CI)	1.9 (1.2 - 3.2)	

Fuente: Elaboración propia

- Análisis de la población según modelo codominante:**

La asociación significativa del rs662 (PON1) con el riesgo de linfoma también se demostró cuando se aplicó el modelo de codominante en toda la población de estudio ( $p = 0.0009$ ). En este caso la distribución por sexo dio los siguientes valores de  $p$  para los géneros masculino y femenino:  $p = 0.016$  y  $0.054$ , respectivamente.

**Tabla 21.** Resultados de genotipado EPHX1, NQO1 y PON1 vs población por genero

		EPHX1 (rs1051740)			NQO1 (rs1800566)			PON1 (rs662)		
		TT	CT	CC	CC	CT	TT	AA	AG	GG
Total	Cases	118 (57.3)	71 (34.5)	17 (8.2)	131 (61.5)	72 (33.8)	10 (4.7)	83 (38.6)	99 (46.0)	33 (15.3)
	Controles	113 (52.8)	83 (38.8)	18 (8.4)	123 (57.5)	78 (36.4)	13 (6.0)	100 (46.7)	104 (48.6)	10 (4.7)
	p (OR; 95%CI)	0,6320			0,6444			0,0009		
♀	Cases	57 (58.2)	36 (36.7)	5 (5.1)	63 (61.2)	34 (33.0)	6 (5.8)	42 (41.2)	47 (46.1)	13 (12.7)
	Controles	61 (53.5)	44 (38.6)	9 (7.9)	64 (56.1)	42 (36.8)	8 (7.0)	59 (51.8)	50 (43.9)	5 (4.4)
	p (OR; 95%CI)	0,6467			0,7494			0,0541		

♂	<b>Cases</b>	61 (56.5)	34 (31.5)	13 (12.0)	68 (61.8)	38 (35.4)	4 (3.6)	41 (36.6)	52 (46.0)	20 (17.7)
	<b>Controles</b>	52 (52.0)	39 (39.0)	9 (9.0)	59 (59.0)	36 (36.0)	5 (5.0)	41 (41.0)	54 (54.0)	5 (5.0)
	<b>p (OR; 95%CI)</b>	0,4786			0,8496			<b>0,0163</b>		

Fuente: Elaboración propia

- **Análisis por tipo de enfermedad**

También se realizó el estudio comparativo de los tres genotipos en función de los diferentes tipos de enfermedad, en concreto LNH, LF, LBDCL y LH.

**Tabla 22.** Resultados de genotipado EPHX1, NQO1 y PON1 vs tipos de linfomas.

	EPHX1 (rs1051740)			NQO1 (rs1800566)			PON1 (rs662)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	AA	AG	GG
<b>Controles</b>	113 (52.8)	83 (38.8)	18 (8.4)	123 (57.5)	78 (36.4)	13 (6.0)	100 (46.7)	104 (48.6)	10 (4.7)
<b>LNH</b>	109 (58.6)	65 (34.9)	12 (6.5)	122 (63.2)	63 (32.6)	8 (4.1)	76 (39.2)	88 (45.4)	30 (15.5)
p (OR; 95%)	0.458 (0.8;0.4-1.6)			0.513 (0.7;0.3-1.6)			0.0005 (3.7;1.8-7.9)		
<b>LF</b>	78 (59.5)	46 (35.1)	7 (5.3)	85 (63.0)	45 (33.3)	5 (3.7)	55 (40.7)	61 (45.2)	19 (14.1)
p (OR; 95%)	0.394 (0.6;0.2-1.5)			0.467 (0.6;0.2-1.7)			<b>0.004 (3.3;1.5-7.4)</b>		
<b>LBDCL</b>	21 (61.8)	10 (29.4)	3 (8.8)	19 (55.9)	12 (35.3)	3 (8.8)	11 (31.4)	18 (51.4)	6 (17.1)
p (OR; 95%)	0.8 (1.1;0.3-3.8)			0.818 (1.5;0.4-5.6)			<b>0.016 (4.2;1.4-12.5)</b>		
<b>LH</b>	9 (45.0)	9 (45.0)	2 (10.0)	9 (45.0)	9 (45.0)	2 (10.0)	7 (33.3)	11 (52.4)	3 (14.3)
p (OR; 95%)	0.861 (1.2;0.3-5.6)			0.835 (1.7;0.4-8.2)			0.181 (3.4; 0.9-13.5)		

Fuente: Elaboración propia

Los datos de las tablas muestran que en el caso del polimorfismo *PON1*, son más frecuentes los casos portadores del genotipo GG en LF (14,1%) y LBDCL (17,1%) que en los controles, siendo las diferencias entre estos grupos y los controles significativas. Por el contrario, los casos LH (14,3%) no mostraron esta asociación.

- **Estudio de desequilibrio de alelos:**

Con fin de determinar el posible efecto combinado, se realizó el análisis conjunto de los genotipos demostrándose que la única combinación significativa fue T-C-G para los polimorfismos *EPHX1*, *NQO1* y *PON1*, con lo cual se obtuvo una OR de 1,73 (IC del 95%: 1,22 a 2,45; p = 0,002) . Como era de esperar, se

demonstró que los polimorfismos estudiados no estaban en desequilibrio de ligamiento ( $D' < 0,21$  y  $r^2 < 0,008$ ).

**Tabla 23.** Resultados del estudio desequilibrio de ligamiento EPHX1, NQO1 y PON1.

Joint	Case (freq)	Control (freq)	Fisher's p	Pearson's p	OR; 95%
CCA	63.1 (0.16)	70.3 (0.16)	0.689	0.689	0.9; 0.6-1.3
CCG	22.3 (0.06)	21.8 (0.05)	0.836	0.836	0.9; 0.6-2.0
CTA	11.1 (0.03)	16.4 (0.04)	0.352	0.352	0.7; 0.3-1.5
TCA	136.2 (0.34)	166.3 (0.39)	0.078	0.078	0.8; 0.6-1.0
TCG	98.0 (0.24)	65.6 (0.15)	0.002	0.002	1.7; 1.2-2.5
TTA	43.2 (0.11)	51.0 (0.12)	0.511	0.511	0.9; 0.6-1.3
TTG	27.6 (0.07)	26.1 (0.06)	0.722	0.722	1.1; 0.6-1.9

Fuente: Elaboración propia

#### 4.3 RESULTADOS DE LOS SNP DE ENZIMAS DE REPARACIÓN Y SÍNTESIS DE ADN (ERCC5, XPA Y MTR.)

Los mecanismos de reparación son imprescindibles para el correcto funcionamiento de las funciones celulares, componen el segundo mecanismo defensivo si el agente lesivo del ADN ha sobrepasado los mecanismos de metabolización. De esta forma la respuesta individual al daño en el ADN inducido por agentes xenobióticos está indirectamente condicionada por la eficacia de los sistemas de reparación. En nuestro estudio analizamos el papel de los polimorfismos en dos enzimas de reparación *XPA* (rs1800975) y *ERCC5* (rs17655); y en un enzima de síntesis, que es *MTR* (rs17655) que forma parte de los mecanismos de reparación pues interviene en la síntesis posterior de la hebra o fragmento dañado.

No se observaron diferencias significativas entre casos y controles en cuanto a edad (media 53.7;  $\pm$ SD 15.1 vs. 53.9 $\pm$ 8.4;  $p=0.866$ ) ni en cuanto a sexo ya que el 49% de los casos fueron mujeres ( $n=104$ ) frente al 53.3% ( $n=114$ ) en la población control ( $p=0.358$ ).

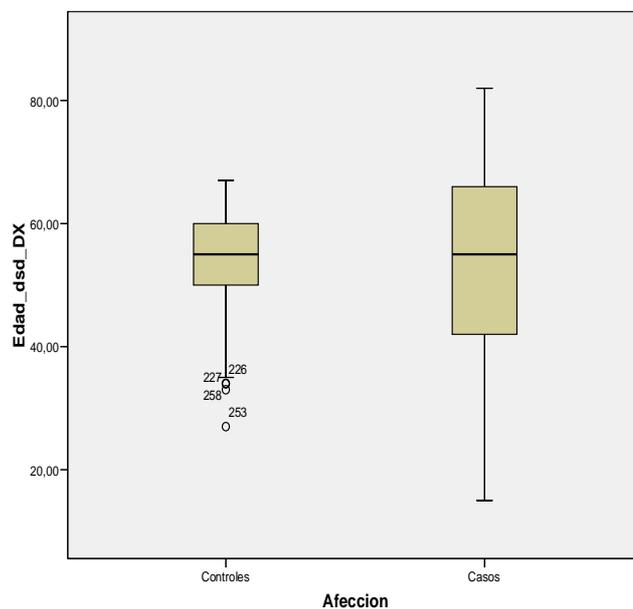
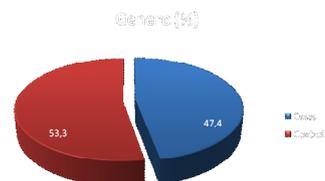
**Tabla 24.** Resultados demográficos de la población a estudio con SNP XPA, ERRC5 y MTR.

	n	Edad (SD)	♀ n (%)
Cases	215	53.7 (15.1)	104 (47.4)
Controles	214	53.9 (8.4)	114 (53.3)
p		0.866	0.358
total	429	53,8(12,8)	218 (50,8)

Fuente: Elaboración propia

**Fig. 43.** Distribución de casos y controles según género femenino

Fuente: Elaboración propia.



**Fig. 44.** Diagrama de caja de los grupos de casos y controles para los SNPs de metabolismo y reparación.

Fuente: Modificado SPSS v.15

- **Análisis de los polimorfismos en la población y por género:**

Se realizó el genotipado de todos los sujetos a estudio. Los resultados se muestran en la tabla y pueden observarse que las frecuencias genotípicas obtenidas son similares a las dadas por HapMap-CEU para población Europea [<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>].

**Tabla 25.** Resultados genotipado SNP XPA, ERCC5 y MTR vs frecuencias HapMap-CEU.

	XPA (rs1800975)			ERCC5 (rs17655)			MTR (1805087)		
	GG	GA	AA	GG	GC	CC	AA	AG	GG
Población estudiada	42.6%	50.1%	7.3%	57.1%	35.6%	7.3%	70.2%	25.1%	4.7%
HapMap-CEU	37.2%	49.6%	13.3%	53.3%	40.0%	6.7%	68.8	30.3%	9.0%

Fuente: Elaboración propia

No se detectaron diferencias significativas en la distribución de genotipos para los polimorfismos rs1800975, rs1805087 y rs17655 entre casos y controles en general, ni cuando se realiza distribución por sexos, como puede verse en la tabla.

**Tabla 26.** Resultados genotipado SNP XPA, ERCC5 y MTR según modelo codominante.

		XPA (GG vs. GG+GA)			ERCC5 (GG vs. GC+CC)			MTR (AA vs. AG+ GG)		
		GG	GA	AA	GG	GC	CC	AA	AG	GG
<b>Total</b>	<b>Cases</b>	90 (42.3)	102(47.9)	21 (9.9)	125 (58.7)	71 (33.3)	17 (8.0)	148 (69.8)	52 (24.5)	12 (5.7)
	<b>Controls</b>	92 (43.0)	112 (52.3)	10 (4.7)	119 (55.6)	81 (37.9)	14 (6.5)	151 (70.6)	55 (25.7)	8 (3.7)
	<b>p (OR; 95%CI)</b>	0.878 (1.0; 0.7-1.4)			0.521 (1.1; 0.8-1.7)			0.866 (1.0; 0.6-1.5)		
♀	<b>Cases</b>	40 (38.5)	54 (51.9)	10 (9.6)	65 (63.1)	34 (33.0)	4 (3.9)	70 (68.6)	26 (25.5)	6 (5.9)
	<b>Controls</b>	47 (41.2)	61 (53.5)	6 (5.3)	65 (57.0)	40 (35.1)	9 (7.9)	83 (72.8)	27 (23.7)	4 (3.5)
	<b>p (OR; 95%CI)</b>	0.677 (0.9; 0.5-1.5)			0.361 (1.3; 0.7-2.2)			0.500 (0.8; 0.5-1.5)		
♂	<b>Cases</b>	50 (45.9)	48 (44.0)	11 (10.1)	60 (45.5)	37 (33.6)	13 (11.8)	78 (70.9)	26 (23.6)	6 (5.5)
	<b>Controls</b>	45 (45.0)	51 (51.0)	4 (4.0)	54 (54.0)	41 (41.0)	5 (5.0)	68 (68.0)	28 (28.0)	4 (4.0)
	<b>p (OR; 95%CI)</b>	0.512; (0.8; 0.5-1.5)			0.937 (1.0; 0.6-1.8)			0.647 (1.1; 0.6-2.1)		

Fuente: Elaboración propia

- Análisis de la población sesgando por tipo de enfermedad:**

En el análisis de los genotipos, clasificando a los casos según el tipo de linfoma que padecen, tampoco se observó diferencia significativa en esta comparativa.

**Tabla 27.** Resultados genotipado SNP XPA, ERCC5 y MTR vs tipos linfomas.

	<i>XPA</i>			<i>ERCC5</i>			<i>MTR</i>		
	GG	GA	AA	GG	GC	CC	AA	AG	GG
<b>Controles</b>	92 (43.0)	112 (52.3)	10 (4.7)	119 (55.6)	81 (37.9)	14 (6.5)	151 (70.6)	55 (25.7)	8 (3.7)
<b>NHL</b>	86 (44.6)	91 (47.2)	16 (8.3)	118 (61.1)	62 (32.1)	13 (6.7)	135 (70.3)	48 (25.0)	9 (4.7)
<b>p (OR; 95%CI)</b>	0.750 (1.1; 0.7-1.6)			0.228 (1.3; 0.9-2.0)			0.956 (1.0; 0.6-1.5)		
<b>FL</b>	56 (49.6)	56 (41.5)	12 (8.9)	81 (60.0)	46 (34.1)	8 (5.9)	90 (67.2)	36 (26.9)	8 (6.0)
<b>p (OR; 95%CI)</b>	0.698 (1.1; 0.7-1.7)			0.884 (1.0; 0.7-1.6)			0.504 (0.9; 0.5-1.4)		
<b>DLBCL</b>	11 (32.4)	20 (58.8)	3 (8.8)	21 (61.8)	8 (23.5)	5 (14.7)	28 (82.4)	6 (17.6)	0 (0)
<b>p (OR; 95%CI)</b>	0.242 (0.6; 0.3-1.4)			0.778 (1.1; 0.5-2.3)			0.154 (1.9; 0.8-4.9)		
<b>HL</b>	4 (20.0)	11 (55.0)	5 (25.0)	7 (35.0)	9 (45.0)	4 (20.0)	13 (65.0)	4 (20.0)	4 (15.0)
<b>p (OR; 95%CI)</b>	0.046 (0.3; 0.1-1.0)			0.037 (0.4; 0.1-1.0)			0.410 (0.7; 0.3-1.7)		

Fuente: Elaboración propia



# DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 POLIMORFISMO DE METABOLIZACIÓN GSTs:

La evidencia científica ha demostrado una asociación entre el riesgo de desarrollo del cáncer y el polimorfismo genético de las enzimas de metabolización de xenobióticos. Los estudios previos dan resultados contradictorios sobre la función de la exposición a agentes químicos compuestos y el desarrollo de linfomas de células B. Esto se explica porque las enzimas GSTs en su función normal de metabolización generan en algunos casos productos más tóxicos que los originales.

Por esta razón decidimos estudiar la distribución de genotipos de *GSTT1* y *GSTM1* en los pacientes LCB y controles, en particular, correlacionar estos genotipos con la exposición a contaminantes. Tal es así, que en estudios anteriores (Kerridge I, et al. 2002; Abdel Rahman HA, et al. 2012), sobre el papel de los polimorfismos de GST y riesgo de linfoma han dado resultados diversos, especialmente referente a los riesgos asociados con el genotipo nulo de *GSTT1*, desde OR de 1.9 para el LH, 4.3 para el LNH y 11.9 de DLBCL.

Nuestros resultados apoyan una asociación entre *GSTT1* null y un aumento en la susceptibilidad a LCB. Las OR para LCB (1.86), LNH (1.72) y LH (3.0) fueron comparables con los proporcionados por Hohaus (Hohaus S, et al. 2003), en estudios previos, otorgando a la presencia del *GSTT1* null como factor pronóstico de la enfermedad. Curiosamente, en ambos estudios, la relación fue más pronunciada en las mujeres, lo que sugiere una asociación con este género, bien por efecto hormonal o por interacción genes y medio ambiente posiblemente relacionados con estilos de vida, lo cual merece un estudio más pormenorizado. Es importante mencionar que, dado el pequeño tamaño de la muestra poblacional a estudio, los resultados obtenidos para el modelo LH de los casos (n=20) en nuestro estudio deben tomarse con precaución.

Como en estudios anteriores (Hohaus S, et al. 2003; Kerridge I, et al. 2002; Sarmanova J, et al. 2001), no detectamos un aumento del riesgo de LCB en los portadores nulos de *GSTM1*. Por el contrario, observamos un cierto papel protector del genotipo *GSTM1* null para el desarrollo LCB en general, y LF en particular. Estos

resultados están en la misma línea de las conclusiones del estudio de Dieckvoss, en el cual se sugiere que la presencia de *GSTM1 null* en enfermos de leucemia linfocítica aguda (LLA) desempeña un papel favorecedor de buena respuesta inicial al tratamiento y un menor riesgo de recaída en LLA infantil (Dieckvoss BO, et al. 2002).

Este papel protector de *GSTM1 null* puede ser debido al hecho de que la mayoría de los pacientes *GSTM1* nulos son portadores del genotipo *GSTT1 plus*, compensando así la ausencia del gen *GSTM1*. Este hallazgo pone de relieve la importancia de *GSTT1* en comparación con *GSTM1* a la hora del desarrollo de procesos cancerígenos, aunque esta hipótesis requiere más estudio.

Dado que las enzimas GST están implicadas en el metabolismo de xenotóxicos, decidimos evaluar el efecto de genotipos nulos *GSTT1* y *GSTM1* en el desarrollo de LCB maduras considerando la exposición a compuestos químicos. No observamos asociación entre el hábito de fumar o exposición ocupacional a compuestos químicos y un mayor riesgo de BCL. Estos resultados concuerdan con estudios previos que han demostrado que la exposición a la contaminación industrial no es un factor etiológico importante para el desarrollo de linfomas (Lopez-Abente G, et al. 2006; Ramis R, et al. 2009). Dado que el tamaño de la muestra de nuestro estudio fue relativamente pequeño, este tema se abordó mediante la evaluación del efecto de estos genotipos nulos por separado de acuerdo al hábito de fumar, exposición geográfica y profesional. El efecto de los pesticidas tiene un papel causal conocido en limfomagénesis (Fritschi L, et al. 2005; Roulland S, et al. 2004), aunque en nuestro estudio fue difícil de evaluar dado el pequeño porcentaje de sujetos expuestos a estos compuestos. No se encontraron diferencias significativas de los genotipos nulos de la enzima GST entre casos y controles expuestos, los resultados sugieren que la asociación observada entre *GSTT1* nulo en los casos fue independiente de la exposición a sustancias químicas. Asimismo, se observó que los casos expuestos mostraron similares frecuencias de *GSTT1* nulo que los casos no expuestos.

## 5.2 POLIMORFISMOS DE ENZIMAS DE METABOLIZACIÓN: EPHX1, NQO1 Y PON1.

Sabemos que las enzimas EPHX1, NQO1 y PON1 metabolizan xenobióticos y juegan un papel importante en la detoxificación de compuestos con potencial carcinogénico. De hecho, numerosos estudios han buscado la asociación entre los polimorfismos en los genes que codifican estas enzimas y el riesgo de desarrollo de cáncer (De Roos AJ, et al. 2006; Kerridge I, et al. 2002; Sarmanova J, et al. 2001).

En nuestro trabajo, hemos estudiado los polimorfismos funcionales de rs1051740, rs1800566 y rs662 en pacientes y controles; buscando una posible relación de asociación entre estos genotipos en población expuesta.

Inicialmente se pensó que la enzima *NQO1*, por su funcionamiento, podía proteger la médula ósea de los daños tóxicos de benceno (Lan Q, et al. 2004) y se planteó la hipótesis de que los individuos con variantes alélicas que ocasionaran disminución de la actividad *NQO1* tendrían un alto riesgo de desarrollo de linfomas sobre todo en aquellos con sobre-exposición a cancerígenos (Rothman N, et al. 1997). Esta teoría se sustenta en un estudio de Siegel, que correlacionó la exposición al pesticida hidrófobo dicloro difenil tricloroetano (DDT) y la presencia de las variantes polimórficas de *NQO1*. En este estudio pudo verse mediante inmuno-histoquímica que la expresión de *NQO1* en células de médula ósea se relacionaba con un mayor riesgo al desarrollo de linfoma no Hodgkin por acumulación del pesticida DDT en medula ósea (Siegel D, et al. 2001). Además el alelo variante también se ha asociado con un mayor riesgo de leucopenia en individuos expuestos a benceno (Moran JL, et al 1999).

Por tanto, la actividad *NQO1* baja o nula debido al polimorfismo puede predisponer a los individuos expuestos a benceno a un mayor riesgo de desarrollo de neoplasias hematológicas (Smith MT, et al. 2001; De Aguiar Goncalves BA, et al. 2012).

Pero esta hipótesis inicial no es del todo cierta, los estudios publicados sobre la asociación entre las variante polimórfica C609T *NQO1* y la susceptibilidad a leucemia (Yamaguti GG, et al. 2010; Krajcinovic M, et al. 2002); muestran resultados contradictorios si bien todos concluyen que la exposición al benceno y los estilos de vida pueden contribuir al desarrollo de este tipo de enfermedades (Wan J, et al. 2002).

Nuestro estudio no relaciona la presencia de las variantes polimórficas rs1051740 *NQO1* con susceptibilidad al desarrollo de linfomas, como se ha descrito en estudios anteriores (De Roos AJ, et al. 2006). A pesar de estos resultados, no podemos descartar una asociación si aplicáramos unos criterios de exposición a pesticidas más rigurosos sobre una población con mayor tamaño muestral y expuesta a este tipo particular de compuestos.

La evidencia científica sobre la influencia de polimorfismos en el exón 3 de *EPHX* tampoco ha sido concluyente; existen diversos estudios y al igual que con otros tipos de cáncer, los resultados son contradictorios. A pesar de que *EPHX* ha sido considerada como un enzima detoxificante, hay que tener en cuenta que dentro de sus funciones también figura la de activar metabolitos del tabaco. En los estudios revisados prevalece más el papel protector de variantes alélicas en este gen, como así lo demuestra el estudio de Sarmanova en el que el alelo mutado del exón 3 está menormente representado en pacientes con LNH, sugiriendo un cierto papel protector de dicho alelo (Sarmanova J, et al. 2001). Esta diferencia es aun más significativa cuando se realiza la distribución por sexo, observándose las mayores diferencias para el género masculino. Otro estudio en población infantil brasileña con alta exposición a factores ambientales (Silveira VS, et al. 2010), demuestra una asociación entre ciertos genotipos en enzimas de detoxificación con un menor riesgo al desarrollo de LLA, aunque los resultados no llegan a la significación. En el estudio de Barry (Barry KH, et al. 2011), en el que se analizaron diversos polimorfismos de detoxificación de tóxicos en individuos expuestos a solventes orgánicos como benceno o diclorometano se observó una relación entre el genotipo salvaje de dicho polimorfismo y una mayor incidencia de LBDCL. Todo ello sugiere que individuos nativo para este SNPs y expuestos a solventes orgánicos tienen un mayor riesgo al desarrollo de diversos tipos de LNH, siendo este efecto más evidente en el grupo de mujeres. Aunque los resultados en general sugieren este papel protector para el alelo minoritario, ninguno muestra una evidencia significativamente estable como para afirmar dicha suposición y, en esta línea, nuestros resultados tampoco demuestran una relación significativa.

En contraste con los dos SNPs anteriores, sí observamos que el polimorfismo rs662 en *PON1*, se asocia esté con el riesgo de linfoma, estando el genotipo GG relacionado con una mayor susceptibilidad al linfoma en general, y en particular al LF y LBDCL. Este hallazgo es concordante con los datos suministrados por Kerridge en un estudio anterior en el que se analizó el ADN del tejido tumoral afecto (Kerridge I, et al. 2002). Un estudio reciente también ha relacionado la presencia del alelo minoritario del rs662 con un riesgo al desarrollo de LNH; pero en personas expuestas, por uso o fabricación, a pesticidas (Kokouva M, et al. 2013) ofreciendo una explicación a la relación observada entre la exposición a pesticidas con un mayor riesgo de LNH (Merhi M, et al. 2007; Chiu BC, et al. 2009).

En nuestro estudio además encontramos que en los casos con exposición residencial es más frecuente la presencia del alelo G frente a los controles que viven en la misma área. Esta observación sugiere que el alelo G variante de *PON1* puede jugar un papel predisponente al desarrollo de linfomas de células B en la población que sufre una alta exposición a contaminantes ambientales. El estudio llevado a cabo por De Roos en 1.172 casos y 982 controles encuentra una asociación parecida con un polimorfismo del *PON1* que no es el rs662 (rs854560) (De Roos AJ, et al. 2006). La razón de esta diferencia puede ser que, en el estudio de De Roos no se han considerado las características de proximidad geográficas a industrias químicas. De hecho, nuestro estudio no encuentra asociación entre el genotipo GG y enfermedad en las zonas no consideradas como expuestas por proximidad a industrias químicas. La identificación del tipo de compuesto o de la industria posiblemente implicado en este efecto podría ser muy interesante pero está fuera del alcance de este estudio.

La realización del análisis combinado de los SNPs estudiados está justificada porque cuando hablamos de una mezcla de diferentes contaminantes, la contribución de los polimorfismos en diferentes enzimas de metabolización podría ejercer un efecto aditivo en la susceptibilidad a la enfermedad que sólo puede ser identificado considerando los SNPs como combinación. Este análisis reveló que la combinación de los polimorfismos de *PON1*, *EPHX1* y *NQO1* no aumenta el riesgo de linfoma cuando

se compara con el riesgo asociado con el polimorfismo *PON1* por sí solo (OR = 1,7 vs 1,5).

En conjunto, nuestros resultados podrían servir como punto de partida para futuros estudios en los que se podría estudiar tanto la actividad contaminante y su interrelación con la presencia de un determinado genotipo.

En este punto es importante tener en cuenta que la limfomagénesis es un proceso multifactorial, y que determinados factores genéticos pueden predeterminar una maquinaria sub-óptima para metabolizar xenobióticos, esto podría explicar algunos de los casos de linfoma que se han desarrollado bajo ciertas condiciones de exposición. La restricción geográfica de los casos y los controles no es una característica común de los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) y a pesar de su indudable utilidad en la evaluación de los determinantes genéticos de las enfermedades este enfoque podría dificultar la comprensión de la contribución de la exposición a xenobióticos en la limfomagénesis (Vijai J, et al. 2013).

### 5.3 POLIMORFISMOS DE ENZIMAS DE METABOLIZACIÓN: XPA, ERCC5 Y MS.

La exposición a los potenciales carcinógenos de cualquier naturaleza, endógena o exógena, puede causar daños en el ADN, pudiendo contribuir al desarrollo del cáncer. Por lo tanto, la eficiencia de la reparación del ADN y la síntesis de maquinaria enzimática es crítica para la disminución de los efectos carcinógenos. Se cree que los polimorfismos en los genes que codifican estas enzimas constituyen una base molecular para las diferencias interindividuales en la susceptibilidad al cáncer. En este sentido, se ha estudiado el efecto de los polimorfismos *XPA*, *ERCC5* y genes *MS* en el riesgo de linfoma. Estos polimorfismos han demostrado un papel en la susceptibilidad diferentes tipos de tumores (Han W, et al. 2012; Cho S, et al. 2011); sin embargo, su papel en el linfoma es poco conocido o controvertido.

La proteína *XPA* es responsable de la reparación de fotoproductos inducidos por la radiación UV y aductos de ADN inducidos por carcinógenos químicos. Este polimorfismo *XPA* se ha asociado con diferencias en el daño del ADN en trabajadores de hornos de coque (Wang F, et al. 2010). Sin embargo, la relación de este polimorfismo

con el desarrollo de enfermedades hematológicas, no está bien definida. Se han estudiado diversos polimorfismos en genes de enzimas de los sistemas de reparación NER y el riesgo de padecer LNH pero no se han encontrado diferencias significativas (Shen M, et al. 2007/2006). En esa misma línea, nuestros resultados no revelaron ninguna asociación de este polimorfismo con la susceptibilidad al linfoma.

En el caso de la enzima ERCC5 forma parte del mecanismo NER de reparación por escisión de nucleótidos. Es un endonucleasa específica de ADN que realiza un corte en una sola hebra, en concreto en el extremo 3' del ADN, en la zona inicial de la reparación. El aumento de exposiciones ocupacionales y ambientales a tóxicos, pueden causar daño al ADN directa o indirectamente y desembocar en el desarrollo de un tipo de LNH. El sistema de reparación del daño en el ADN humano puede reconocer y reparar tales daños y mantener la estabilidad genómica y la presencia de polimorfismos en estas proteínas podría ser considerada un agente causal en algunos casos; aunque son pocos los estudios que analizan dicha asociación. En un estudio realizado en la Universidad de Connecticut sobre población femenina, se evaluó la asociación entre la presencia del polimorfismo Asp1104His de *ERRC5* y el riesgo a padecer LNH, observándose un mayor riesgo de padecer LNH en general, y particularmente LF y LBDCL (Shen M, et al. 2006). En nuestro estudio, de acuerdo con la mayoría de estudios anteriores (Zhu ML, et al. 2012) que no observaron ninguna relación entre este polimorfismo y la susceptibilidad linfoma, tampoco observamos significación alguna en nuestra población analizada.

La proteína MS cataliza el último paso en la biosíntesis de metionina y está implicado en la síntesis de ADN y metilación. Los estudios previos son contradictorios respecto a la relación de polimorfismos en *MS* con riesgo a desarrollar LNH (Weiner AS, et al. 2011), estableciéndose la hipótesis sobre los mecanismos por los que diferentes genotipos de la enzima *MS* puede "afectar" o "proteger" a la generación de enfermedades hematológicas. Los genotipos que disminuyen la actividad de la enzima pueden reducir el riesgo de translocaciones cromosómicas y reducir el número de hipermetilación del ADN, que son características comunes de las enfermedades

linfoproliferativas. La metilación de los genes supresores de tumores en regiones islas CpG en el extremo 5' de la región promotora provoca la inhibición de la expresión del gen (silenciamiento genómico por metilación). Por tanto, se produce la des-regulación del ciclo celular, afectando a la reparación del ADN y a la apoptosis, siendo un método común el "silenciamiento génico" esencial para la proliferación de células neoplásicas (Rhee I, et al. 2002). Se ha demostrado recientemente que tanto el número global y el perfil particular de los sitios de metilación están correlacionados con el tipo celular de cáncer, de tal manera que las neoplasias malignas hematológicas tienen una alta frecuencia de hipermetilación de los genes supresores de tumores p73 y p15INK4b, que rara vez se observan en tumores sólidos (Esteller M, et al. 2001). Por tanto, los genotipos de MS que confieren baja actividad ocasionan una hipometilación de estos genes, y no se "silencian", ejerciendo su función supresora del tumor correctamente. Este efecto protector frente a LNH asociado a la presencia de las variantes polimórficas 2756 AG/GG se ha demostrado en diferentes estudios (Lincz LF, et al. 2003); Matsuo (Matsuo K, et al. 2001).

A este efecto hay que añadir el folato y el metabolismo de la metionina, ambos juegan un importante papel en el desarrollo de linfomas y enfermedades hematológicas en general (Matsuo K, et al. 2001). En el estudio de Gemmati, analizan la posible implicación de las enzimas del metabolismo del folato y las posibles consecuencias por la presencia de polimorfismos, añadiendo además la posible implicación de los factores ambientales como elementos a tener en cuenta (Gemmati D, et al. 2004). En su estudio, observaron incorrecciones en la síntesis de ADN o estados de metilación alterados, que puede afectar a oncogenes y/o genes supresores de tumores, y su implicación en la patogénesis de los tumores malignos linfoides.

Aunque los medios por los cuales pueden modular el riesgo de cáncer aún no están claramente establecidos, sí debemos considerar que situaciones ambientales desfavorables como la ingesta inadecuada de micronutrientes (inanición) o el déficit de absorción de folatos (alcohólicos), pueden actuar en concordancia con genotipos particulares de riesgo del cáncer (Zingg JM, et al. 1997; Niclot S, et al. 2006). Por tanto,

la evaluación de folato se debe llevar a cabo ya que sus niveles podrían enmascarar/influir en el efecto protector de las variantes genéticas

La medida del papel biológico del SNP *MS A2756G* no es del todo claro hasta ahora siendo difícil establecer asociaciones claras entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer en población europea. Nuestro estudio estaría en la línea de los que no observan asociación (Lee KM, et al. 2007; Lightfoot TJ, et al. 2005).

La evidencia científica parece indicar que este polimorfismo afecta al metabolismo de folato y a la síntesis de metionina, con lo cual se afectaría la producción de sustratos necesarios para la síntesis del ADN y por tanto también se afectarían los mecanismos de reparación. Además, no podemos obviar el hecho de que existen situaciones en las que se requiere un exceso de reparación del ADN como en la exposición a tóxicos ambientales que ocasionan daño al ADN. Las conclusiones definitivas, sin embargo, deben elaborarse con sumo cuidado, y se requieren estudios epidemiológicos más grandes o meta-análisis para confirmar los resultados actuales.



# CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES:

- Nuestros resultados apoyan que la presencia del genotipo *GSTT1* nulo es un factor de riesgo para el desarrollo de neoplasias maduras de células B. Este efecto fue particularmente prominente en las mujeres. No podemos asegurar que el tabaquismo y la exposición ocupacional a compuestos químicos estén implicados en el proceso carcinogénico, en los individuos expuestos.
- Nuestro estudio es el primero en describir que el polimorfismo rs662 *PON1* en línea germinal se asocia con el riesgo de linfoma, aunque los resultados han de ser confirmados en estudios independientes posteriores con mayor tamaño muestral.
- La asociación del polimorfismo rs662 *PON1* con el desarrollo a linfoma de células B maduras muestra una dependencia con la proximidad de industrias químicas de los sujetos de estudio.
- Para los polimorfismos rs1800975, rs1805087 y rs17655 en los genes *XPA*, *ERCC5* y *MTR*, implicados reparación y síntesis del ADN, no observamos una relación con mayor riesgo de linfoma sugiriendo que no desempeñan un papel importante en la linfomagénesis.



## BIBLIOGRAFIA

- Abdel Rahman HA, Khorshied MM, Elazzamy HH, Khorshid OM. The link between genetic polymorphism of glutathione-S-transferases, GSTM1, and GSTT1 and diffuse large B-cell lymphoma in Egypt. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012 Aug;138(8):1363-8.
- Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, et al. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* 1995 Mar 24;80(6):859-68.
- Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993 Mar;52(3):598-608.
- AEAL. Asociacion Española de Linfoma, Mieloma y Leucemia. *Revista Asociacion Española de Linfoma, Mieloma y Leucemia* . 2013.  
Ref Type: Internet Communication
- Alavanja MC, Bonner MR. Occupational pesticide exposures and cancer risk: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2012;15(4):238-63.
- American Cancer Society. *Cancer facts & figures*. American Cancer Society; 2013 . 2013.  
Ref Type: Journal (Full)
- Anna Cabanes Domenech Beatriz Pérez-Gómez Nuria Aragonés Marina Pollán Gonzalo López-Abente. LA SITUACIÓN DEL CÁNCER EN ESPAÑA, 1975-2006. CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA INSTITUTO DE SALUD CARLOS III. 2009.
- Asociación Española de Toxicología (AETOX). *Revista de toxicología*. *Revista de toxicología* 1996;21(2-3).
- Ates NA, Tamer L, Ates C, Ercan B, Elipek T, Ocal K, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, P1 genotypes and risk for development of colorectal cancer. *Biochem Genet* 2005 Apr;43(3-4):149-63.
- Au WW. Life style factors and acquired susceptibility to environmental disease. *Int J Hyg Environ Health* 2001 Oct;204(1):17-22.
- Awasthi YC, Sharma R, Singhal SS. Human glutathione S-transferases. *Int J Biochem* 1994 Mar;26(3):295-308.
- Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. *Asian J Androl* 2007 Jan;9(1):108-15.
- Ángel Miguel Alonso Sánchez, Raquel Andrés Conejero, Alberto Cascón Soriano. *CÁNCER HEREDITARIO*. 2006.
- Baena AV, Allam MF, Del Castillo AS, Diaz-Molina C, Requena Tapia MJ, Abdel-Rahman AG, et al. Urinary bladder cancer risk factors in men: a Spanish case-control study. *Eur J Cancer Prev* 2006 Dec;15(6):498-503.
- Balding DJ. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 2006 Oct;7(10):781-91.
- Barry KH, Zhang Y, Lan Q, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, et al. Genetic variation in metabolic genes, occupational solvent exposure, and risk of non-hodgkin

- lymphoma. *Am J Epidemiol* 2011 Feb 15;173(4):404-13.
- Bartkova J, Lukas J, Muller H, Luthoft D, Strauss M, Bartek J. Cyclin D1 protein expression and function in human breast cancer. *Int J Cancer* 1994 May 1;57(3):353-61.
- Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000 Jan;9(1):3-28.
- Beall HD, Murphy AM, Siegel D, Hargreaves RH, Butler J, Ross D. Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate): quinone oxidoreductase (DT-diaphorase) as a target for bioreductive antitumor quinones: quinone cytotoxicity and selectivity in human lung and breast cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 1995 Sep;48(3):499-504.
- Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res* 1998 Dec 1;58(23):5291-3.
- Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1999 Jan 15;27(2):573-80.
- Berneburg M, Lehmann AR. Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv Genet* 2001;43:71-102.
- Beskid O, Binkova B, Dusek Z, Rossner P, Solansky I, Kalina I, et al. Chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization (FISH)--Biomarker of exposure to carcinogenic PAHs. *Mutat Res* 2007 Jul 1;620(1-2):62-70.
- Besses C WSS-SJ. Linfomas malignos no Hodgkinianos. Clasificación y descripción de sus distintas variedades. 1994.
- Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 1995 Sep 7;11(5):1005-11.
- Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson PC, Hsu C, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000 Nov;28(11):1335-42.
- Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001 Oct;1(1):46-54.
- BO Murcia. Decreto: 23/1990. BO de la Region de Murcia 25 Abril 1990, num 94. 1979. 25-5-1990. Ref Type: Statute
- BOE-España. Real D: 1197/1979 de 20 de Febrero, por el que se declara aplicable a parte del término municipal de Cartagena (Murcia) las medidas y beneficios previstos en la Ley 38/1972 de Diciembre, y Reglamentación complementaria de protección del ambiente atmosférico]. Spanish Government Official Bulletin (BOE) 1979, 123:11406. 123-11406. 1979. 1-1-1979. Ref Type: Statute
- Bonassi S, Hagmar L, Stromberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res* 2000 Mar 15;60(6):1619-25.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003 Mar;33 Suppl:228-37.
- Branzei D, Foiani M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Apr;9(4):297-308.

- Bredschneider M, Klein K, Murdter TE, Marx C, Eichelbaum M, Nussler AK, et al. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase A1, the major glutathione S-transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. *Clin Pharmacol Ther* 2002 Jun;71(6):479-87.
- Burchell B, Brierley CH, Rance D. Specificity of human UDP-glucuronosyltransferases and xenobiotic glucuronidation. *Life Sci* 1995;57(20):1819-31.
- Butkiewicz D, Rusin M, Harris CC, Chorazy M. Identification of four single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes: XPA and XPB (ERCC3) in Polish population. *Hum Mutat* 2000 Jun;15(6):577-8.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 1999 Jul;22(3):231-8.
- Cariaso M, Lennon G. SNPedia: a wiki supporting personal genome annotation, interpretation and analysis. *Nucleic Acids Res* 2012 Jan;40(Database issue):D1308-D1312.
- Cascinu S, Cordella L, Del FE, Fronzoni M, Catalano G. Neuroprotective effect of reduced glutathione on cisplatin-based chemotherapy in advanced gastric cancer: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 1995 Jan;13(1):26-32.
- Chambers JE. PON1 multitasks to protect health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 2;105(35):12639-40.
- Chen K, Jiang QT, He HQ. Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005 Jan 21;11(3):331-5.
- Chiu BC, Blair A. Pesticides, chromosomal aberrations, and non-Hodgkin's lymphoma. *J Agromedicine* 2009;14(2):250-5.
- Cho S, Kim MJ, Choi YY, Yoo SS, Lee WK, Lee EJ, et al. Associations between polymorphisms in DNA repair genes and TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2011 Jul;73(1):25-31.
- Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003 Nov 15;193(1-2):3-34.
- Clapper ML. Genetic polymorphism and cancer risk. *Curr Oncol Rep* 2000 May;2(3):251-6.
- Coggon D, Harris EC, Poole J, Palmer KT. Mortality of workers exposed to ethylene oxide: extended follow up of a British cohort. *Occup Environ Med* 2004 Apr;61(4):358-62.
- Connors KA. Chemical kinetics the study of reaction rates in solution. New York, N.Y: VCH; 1998.
- Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005 Feb 15;69(4):541-50.
- Cotton SC, Sharp L, Little J, Brockton N. Glutathione S-transferase polymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2000 Jan 1;151(1):7-32.
- Crawford DC, Nickerson DA. Definition and clinical importance of haplotypes. *Annu Rev Med* 2005;56:303-20.
- Davis CD, Uthus EO. DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004 Nov;229(10):988-95.
- De Aguiar Goncalves BA, Vasconcelos GM, Thuler LC, Andrade C, Faro A, Pombo-de-Oliveira MS, et al. NQO1 rs1800566 (C609T),

- PON1 rs662 (Q192R), and PON1 rs854560 (L55M) polymorphisms segregate the risk of childhood acute leukemias according to age range distribution. *Cancer Causes Control* 2012 Nov;23(11):1811-9.
- De Roos AJ, Gold LS, Wang S, Hartge P, Cerhan JR, Cozen W, et al. Metabolic gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 Sep;15(9):1647-53.
- Delgado Cirilo A, Minguillón Llombart C, Joglar Tamargo J. Introducción a la química terapéutica / Antonio Delgado Cirilo, Cristina Minguillón Llombart, Jesús Joglar Tamargo. 2 ed ed. Madrid: Díaz de Santos.
- Devlin TM. Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas. II. 3{487} ed ed. Barcelona etc.: Reverté; 2000.
- Dianov G, Price A, Lindahl T. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol Cell Biol* 1992 Apr;12(4):1605-12.
- Dickinson BC, Chang CJ. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* 2011 Aug;7(8):504-11.
- Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001 Nov;31(5):1106-1.
- Dieckvoss BO, Stanulla M, Schrappe M, Beier R, Zimmermann M, Welte K, et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes in pediatric non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2002 Jul;87(7):709-13.
- Ding D, Zhang Y, Yu H, Guo Y, Jiang L, He X, et al. Genetic variation of XPA gene and risk of cancer: a systematic review and pooled analysis. *Int J Cancer* 2012 Jul 15;131(2):488-96.
- Donato F, Boffetta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998 Jan 30;75(3):347-54.
- Tomás M. Díaz Román, María E. Faxas García, María del C. Arango Prado. Factores etiopatogénicos y moleculares en la génesis del cáncer. *Rev Cubana Oncol* 1998 , 42-50. 1998.
- Duan J, Wainwright MS, Comerón JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, et al. Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 2003 Feb 1;12(3):205-16.
- Dusinska M, Dzapinkova Z, Wsolova L, Harrington V, Collins AR. Possible involvement of XPA in repair of oxidative DNA damage deduced from analysis of damage, repair and genotype in a human population study. *Mutagenesis* 2006 May;21(3):205-11.
- Eaton DL, Bammler TK. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicol Sci* 1999 Jun;49(2):156-64.
- Ellenhorn MJ. Ellenhorn medical toxicology, diagnosis and treatment of human poisoning. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. 2nd. ed ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997.
- Epe B, Mutzel P, Adam W. DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vitro. *Chem Biol Interact* 1988;67(1-2):149-65.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001 Apr 15;61(8):3225-9.
- Evans E, Moggs JG, Hwang JR, Egly JM, Wood RD. Mechanism of open complex and

- dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO J* 1997 Nov 3;16(21):6559-73.
- Evans E, Fellows J, Coffey A, Wood RD. Open complex formation around a lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein. *EMBO J* 1997 Feb 3;16(3):625-38.
- Farinha P, Gascoyne RD. Helicobacter pylori and MALT lymphoma. *Gastroenterology* 2005 May;128(6):1579-605.
- Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987 Oct 9;238(4824):193-7.
- Feig DI, Loeb LA. Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduced fidelity of mammalian DNA polymerase beta. *Biochemistry* 1993 Apr 27;32(16):4466-73.
- Feng J, Sun X, Sun N, Qin S, Li F, Cheng H, et al. XPA A23G polymorphism is associated with the elevated response to platinum-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009 May;41(5):429-35.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
- Frank SA, Nowak MA. Problems of somatic mutation and cancer. *Bioessays* 2004 Mar;26(3):291-9.
- Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001 Oct;1(1):22-33.
- Fritschi L, Benke G, Hughes AM, Krickler A, Turner J, Vajdic CM, et al. Occupational exposure to pesticides and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol* 2005 Nov 1;162(9):849-57.
- Gauderman WJ. Sample size requirements for matched case-control studies of gene-environment interaction. *Stat Med* 2002 Jan 15;21(1):35-50.
- Gemmati D, Ongaro A, Scapoli GL, Della PM, Tognazzo S, Serino ML, et al. Common gene polymorphisms in the metabolic folate and methylation pathway and the risk of acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in adults. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004 May;13(5):787-94.
- Gensler HL, Bernstein H. DNA damage as the primary cause of aging. *Q Rev Biol* 1981 Sep;56(3):279-303.
- Georgakilas AG, Aziz K, Ziech D, Georgakila S, Panayiotidis MI. BRCA1 involvement in toxicological responses and human cancer etiology. *Toxicol Lett* 2009 Jul 24;188(2):77-83.
- Gibbs GW, Berry G. Mesothelioma and asbestos. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008 Oct;52(1 Suppl):S223-S231.
- Gil Hernández F. *Tratado de medicina del trabajo*. Barcelona: Masson; 2005
- Gisbert Calabuig JA, Villanueva Cañadas E. *Medicina legal y toxicología: Gisbert Calabuig*. 6 ed., ed. Barcelona: Masson; 2005.
- Goodman MF. Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 2002;71:17-50.
- Gowda S, Kumaran M, Suma BS, Rao MR. Single nucleotide polymorphism analysis of the nucleotide excision repair genes XPC, XPA, and XPG in the Indian population. *Hum Biol* 2007 Oct;79(5):545-62.
- Gray J, Evans N, Taylor B, Rizzo J, Walker M. State of the evidence: the connection between breast cancer and the environment. *Int J Occup Environ Health* 2009 Jan;15(1):43-78.

- Griffiths AJF. *Genética moderna* / Anthony J. F. Griffiths... [et al.]. Madrid, etc: McGraw-Hill Interamericana de España; 2000.
- Guengerich FP. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol Ther* 1992;54(1):17-61.
- Gulick AM, Fahl WE. Mammalian glutathione S-transferase: regulation of an enzyme system to achieve chemotherapeutic efficacy. *Pharmacol Ther* 1995 May;66(2):237-57.
- Gutierrez PL. The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-Diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review. *Free Radic Biol Med* 2000 Aug;29(3-4):263-75.
- Guyton AC. *Fisiología humana*. 6 ed ed. México etc.: Interamericana; 1987.
- Hahn WC, Weinberg RA. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2002 May;2(5):331-41.
- Hakim J. Pharmacologic control of intracellular signaling pathways: from research to therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995;25 Suppl 2:S106-S113.
- Han W, Kim KY, Yang SJ, Noh DY, Kang D, Kwack K. SNP-SNP interactions between DNA repair genes were associated with breast cancer risk in a Korean population. *Cancer* 2012 Feb 1;118(3):594-602.
- Hanawalt PC. Controlling the efficiency of excision repair. *Mutat Res* 2001 Feb 25;485(1):3-13.
- Harmon DL, Shields DC, Woodside JV, McMaster D, Yarnell JW, Young IS, et al. Methionine synthase D919G polymorphism is a significant but modest determinant of circulating homocysteine concentrations. *Genet Epidemiol* 1999 Nov;17(4):298-309.
- Harris EL. Importance of heritable and nonheritable variation in cancer susceptibility: evidence from a twin study. *J Natl Cancer Inst* 1997 Feb 19;89(4):270-2.
- Hassett C.1, Robinson KB, Beck NB, Omiecinski CJ. The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics* 1994 Sep 15;23(2):433-42.
- Hassett C.2, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet* 1994 Mar;3(3):421-8.
- Hattori M. [Finishing the euchromatic sequence of the human genome]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2005 Feb;50(2):162-8.
- Hayes JD, Pulford DJ. 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* 1995;30(6):445-600.
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:51-88.
- Hecht SS CSVPHJB. Analisis de Fenantreno y Benzo(a)pirenos tetraol en orina humana: la pertinencia de la hipótesis de la región bahía diol epóxido bezeno(a)pireno carcinogénesis y estudios de biomarcadores. *Res Toxicologic* 2010 Mayo 17; 23 (5): 900-8. 2014. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Hemminki K, Koskinen M, Rajaniemi H, Zhao C. Dna adducts, mutations, and cancer 2000. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000 Dec 1;32(3):264-75.
- Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, et al.

Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect Dis* 2002 Jun;2(6):344-52.

Hohaus S, Massini G, D'Alo' F, Guidi F, Putzulu R, Scardocci A, et al. Association between glutathione S-transferase genotypes and Hodgkin's lymphoma risk and prognosis. *Clin Cancer Res* 2003 Aug 15;9(9):3435-40.

Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993 Jan;3(1):73-6.

Infante-Rivard C, Vermunt JK, Weinberg CR. Excess transmission of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism in families of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Epidemiol* 2007 Jun 1;165(11):1248-54.

International Agency for Research on Cancer 1. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans.- Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. 1-1-1994. Ref Type: Serial (Book, Monograph)

International Agency Research. Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008.

International Programme on Chemical Safety. (INCHEM), ;Poisons Information Monograph: Ethylen Oxide. 1-1-1999.

Ito S, Kuraoka I, Chymkowitz P, Compe E, Takedachi A, Ishigami C, et al. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell* 2007 Apr 27;26(2):231-43.

Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 2006 Feb;106(2):302-23.

James SJ, Pogribny IP, Pogribna M, Miller BJ, Jernigan S, Melnyk S. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J Nutr* 2003 Nov;133(11 Suppl 1):3740S-7S.

Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* 2012 Jul;37(3):503-17.

Johannsen E, Koh E, Mosialos G, Tong X, Kieff E, Grossman SR. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol* 1995 Jan;69(1):253-62.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002 Jun;3(6):415-28.

Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, et al. The pregnane X receptor: a promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution. *Mol Endocrinol* 2000 Jan;14(1):27-39.

Joseph PD. Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics* 2010;2010:876940.

Joshi TK, Gupta RK. Asbestos in developing countries: magnitude of risk and its practical implications. *Int J Occup Med Environ Health* 2004;17(1):179-85.

Kadlubar FF. Biochemical individuality and its implications for drug and carcinogen metabolism: recent insights from acetyltransferase and cytochrome P4501A2

- phenotyping and genotyping in humans. *Drug Metab Rev* 1994;26(1-2):37-46.
- Karahalil B, Bohr VA, Wilson DM, III. Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk. *Hum Exp Toxicol* 2012 Oct;31(10):981-1005.
- Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997 Dec;387(3):147-63.
- Kaufmann WK. Pathways of human cell post-replication repair. *Carcinogenesis* 1989 Jan;10(1):1-11.
- Kelsey KT, Ross D, Traver RD, Christiani DC, Zuo ZF, Spitz MR, et al. Ethnic variation in the prevalence of a common NAD(P)H quinone oxidoreductase polymorphism and its implications for anti-cancer chemotherapy. *Br J Cancer* 1997;76(7):852-4.
- Kerridge I, Lincz L, Scorgie F, Hickey D, Granter N, Spencer A. Association between xenobiotic gene polymorphisms and non-Hodgkin's lymphoma risk. *Br J Haematol* 2002 Aug;118(2):477-81.
- Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, et al. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environ Health Perspect* 1992 Nov;98:87-94.
- Khuder SA, Schaub EA, Keller-Byrne JE. Meta-analyses of non-Hodgkin's lymphoma and farming. *Scand J Work Environ Health* 1998 Aug;24(4):255-61.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997 Apr 24;386(6627):761, 763.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998 May 15;280(5366):1036-7.
- Kiyohara C, Yoshimasu K, Takayama K, Nakanishi Y. EPHX1 polymorphisms and the risk of lung cancer: a HuGE review. *Epidemiology* 2006 Jan;17(1):89-99.
- Knudson AG, Jr. Overview: genes that predispose to cancer. *Mutat Res* 1991 Apr;247(2):185-90.
- Koberle B, Roginskaya V, Wood RD. XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair (Amst)* 2006 May 10;5(5):641-8.
- Kohno T, Yokota J. [Genetic factors involved in cancer susceptibility]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002 Jul;29(7):1255-62.
- Kokouva M, Koureas M, Dardiotis E, Almpanidou P, Kalogeraki A, Kyriakou D, et al. Relationship between the paraoxonase 1 (PON1) M55L and Q192R polymorphisms and lymphohaematopoietic cancers in a Greek agricultural population. *Toxicology* 2013 May 10;307:12-6.
- Koolman J. *Bioquímica humana texto y atlas*. 4 ed., totalmente rev. y ampl ed. Madrid etc.: Panamericana; 2012.
- Koutros S, Lynch CF, Ma X, Lee WJ, Hoppin JA, Christensen CH, et al. Heterocyclic aromatic amine pesticide use and human cancer risk: results from the U.S. Agricultural Health Study. *Int J Cancer* 2009 Mar 1;124(5):1206-12.
- Krajcinovic M, Sinnett H, Richer C, Labuda D, Sinnett D. Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer* 2002 Jan 10;97(2):230-6.

- Krewski D, Thorslund T, Withey J. Carcinogenic risk assessment of complex mixtures. *Toxicol Ind Health* 1989 Oct;5(5):851-67.
- Kruszyna L, Lianeri M, Rydzanicz M, Gajecka M, Szyfter K, Jagodzinski PP. Polymorphic variants of folate metabolism genes and the risk of laryngeal cancer. *Mol Biol Rep* 2010 Jan;37(1):241-7.
- Kuljukka-Rabb T, Nylund L, Vaaranrinta R, Savela K, Mutanen P, Veidebaum T, et al. The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2002 Jan;12(1):81-91.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009;4(7):1073-81.
- Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 2005;74:681-710.
- Laborde E. Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death. *Cell Death Differ* 2010 Sep;17(9):1373-80.
- Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science* 2004 Dec 3;306(5702):1774-6.
- Landi S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. *Mutat Res* 2000 Oct;463(3):247-83.
- Larrea AA, Lujan SA, Kunkel TA. SnapShot: DNA mismatch repair. *Cell* 2010 May 14;141(4):730.
- Lee KM, Lan Q, Krickler A, Purdue MP, Grulich AE, Vajdic CM, et al. One-carbon metabolism gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma in Australia. *Hum Genet* 2007 Dec;122(5):525-33.
- Levin DS, McKenna AE, Motycka TA, Matsumoto Y, Tomkinson AE. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair. *Curr Biol* 2000 Jul 27;10(15):919-22.
- Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, et al. A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell Res* 2009 Apr;19(4):519-23.
- Lightfoot TJ, Skibola CF, Willett EV, Skibola DR, Allan JM, Coppede F, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Dec;14(12):2999-3003.
- Lin MT, Storer B, Martin PJ, Tseng LH, Gooley T, Chen PJ, et al. Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* 2003 Dec 4;349(23):2201-10.
- Lincz LF, Scorgie FE, Kerridge I, Potts R, Spencer A, Enno A. Methionine synthase genetic polymorphism MS A2756G alters susceptibility to follicular but not diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003 Mar;120(6):1051-4.
- Lind C, Cadenas E, Hochstein P, Ernster L. DT-diaphorase: purification, properties, and function. *Methods Enzymol* 1990;186:287-301.
- Lindahl T. DNA repair. DNA surveillance defect in cancer cells. *Curr Biol* 1994 Mar 1;4(3):249-51.
- Linford NJ, Schriener SE, Rabinovitch PS. Oxidative damage and aging: spotlight on mitochondria. *Cancer Res* 2006 Mar 1;66(5):2497-9.

- Liu F, Yuan D, Wei Y, Wang W, Yan L, Wen T, et al. Systematic review and meta-analysis of the relationship between EPHX1 polymorphisms and colorectal cancer risk. *PLoS One* 2012;7(8):e43821.
- Liu J, Zhang Z, Cao XL, Lei DP, Wang ZQ, Jin T, et al. XPA A23G polymorphism and susceptibility to cancer: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* 2012 Jun;39(6):6791-9.
- Liu Y, Prasad R, Beard WA, Kedar PS, Hou EW, Shock DD, et al. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/aprimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta. *J Biol Chem* 2007 May 4;282(18):13532-41.
- Lopez-Abente G, Hernandez-Barrera V, Pollan M, Aragonés N, Perez-Gomez B. Municipal pleural cancer mortality in Spain. *Occup Environ Med* 2005 Mar;62(3):195-9.
- Lopez-Abente G, Aragonés N, Ramis R, Hernandez-Barrera V, Perez-Gomez B, Escolar-Pujolar A, et al. Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: possible role of mining and industry. *BMC Public Health* 2006;6:17.
- Lu C, Spitz MR, Zhao H, Dong Q, Truong M, Chang JY, et al. Association between glutathione S-transferase pi polymorphisms and survival in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2006 Jan 15;106(2):441-7.
- Lu M, Wang F, Qiu J. Methionine synthase A2756G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis involving 18,953 subjects. *Breast Cancer Res Treat* 2010 Aug;123(1):213-7.
- Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012;2012:736837.
- Margison GP, Santibanez-Koref MF. O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *Bioessays* 2002 Mar;24(3):255-66.
- Masque-Soler N, Szczepanowski M, Kohler CW, Spang R, Klapper W. Molecular classification of mature aggressive B-cell lymphoma using digital multiplexed gene expression on formalin-fixed paraffin-embedded biopsy specimens. *Blood* 2013 Sep 12;122(11):1985-6.
- Matsumoto Y, Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 1995 Aug 4;269(5224):699-702.
- Matsuo K, Suzuki R, Hamajima N, Ogura M, Kagami Y, Taji H, et al. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. *Blood* 2001 May 15;97(10):3205-9.
- Mendoza Patiño N. *Farmacología médica*. 2008.
- Merhi M, Raynal H, Cahuzac E, Vinson F, Cravedi JP, Gamet-Payrastre L. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. *Cancer Causes Control* 2007 Dec;18(10):1209-26.
- Miguel Urioste. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas(CNIO).- *Cancer Hereditario*. 2013. Ref Type: Online Source
- Mitra S, Kaina B. Regulation of repair of alkylation damage in mammalian genomes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1993;44:109-42.
- Mitra S, Hazra TK, Roy R, Ikeda S, Biswas T, Lock J, et al. Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells. *Mol Cells* 1997 Jun 30;7(3):305-12.

- Modrich P. Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 2006 Oct 13;281(41):30305-9.
- Monzo M, Brunet S, Urbano-Ispizua A, Navarro A, Perea G, Esteve J, et al. Genomic polymorphisms provide prognostic information in intermediate-risk acute myeloblastic leukemia. *Blood* 2006 Jun 15;107(12):4871-9.
- Moore LE, Malats N, Rothman N, Real FX, Kogevinas M, Karami S, et al. Polymorphisms in one-carbon metabolism and trans-sulfuration pathway genes and susceptibility to bladder cancer. *Int J Cancer* 2007 Jun 1;120(11):2452-8.
- Moran JL, Siegel D, Ross D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jul 6;96(14):8150-5.
- Morrison RT, Boyd RN, Méndez Stivalet JM, León Cedeo F. Química orgánica problemas resueltos. 1992.
- Mullenders LH, Berneburg M. Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J Photochem Photobiol B* 2001 Dec 31;65(2-3):97-100.
- National Toxicology Program.(NTP) Ethylene oxide. *Rep Carcinog* 2011;12:188-91.
- Neumann HG, Albrecht O, van DC, Zwirner-Baier I. Macromolecular adducts caused by environmental chemicals. *Clin Chem* 1995 Dec;41(12 Pt 2):1835-40.
- Niclot S, Pruvot Q, Besson C, Savoy D, Macintyre E, Salles G, et al. Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. *Blood* 2006 Jul 1;108(1):278-85.
- Obiols Quinto J, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (Madrid), Centro Nacional de Condiciones de Trabajo (Espaa). Control biológico de los trabajadores expuestos a contaminantes químicos. Madrid: Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo; 1998.
- Park BK, Pirmohamed M, Kitteringham NR. The role of cytochrome P450 enzymes in hepatic and extrahepatic human drug toxicity. *Pharmacol Ther* 1995;68(3):385-424.
- Park JY, Park SH, Choi JE, Lee SY, Jeon HS, Cha SI, et al. Polymorphisms of the DNA repair gene xeroderma pigmentosum group A and risk of primary lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002 Oct;11(10 Pt 1):993-7.
- Pastorelli R, Guanci M, Cerri A, Negri E, La VC, Fumagalli F, et al. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, and blood protein adducts of benzo(a)pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998 Aug;7(8):703-9.
- Paz MF, Avila S, Fraga MF, Pollan M, Capella G, Peinado MA, et al. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors. *Cancer Res* 2002 Aug 1;62(15):4519-24.
- Perera FP, Tang D, Rauh V, Lester K, Tsai WY, Tu YH, et al. Relationships among polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, proximity to the World Trade Center, and effects on fetal growth. *Environ Health Perspect* 2005 Aug;113(8):1062-7.
- NIEHS SNPS SIFT/ [computer program]. 2014.
- Ponder BA, Wilkinson MM. Direct examination of the clonality of carcinogen-induced colonic epithelial dysplasia in

- chimeric mice. *J Natl Cancer Inst* 1986 Oct;77(4):967-76.
- Porter R, Teich M. *Drugs and narcotics in history*. 1st publ., repr ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
- Pott P. [The first description of an occupational cancer in 1777 (scrotal cancer, cancer of chimney sweeps)]. *Bull Soc Liban Hist Med* 1993;(4):98-101.
- Prof.Castell. *Metabolismo hepático de xenobióticos,-Las reacciones hepáticas de detoxificación*.2008.  
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- Qian B, Zhang H, Zhang L, Zhou X, Yu H, Chen K. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. *Lung Cancer* 2011 Aug;73(2):138-46.
- Quiñones L, Berthou F, Varela N, Simon B, Gil L, Lucas D. Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations. *Cancer Lett* 1999 Jul 1;141(1-2):167-71.
- Quiñones L, Lee K, Varela FN, Escala M, Garcia K, Godoy L, et al. [Cancer pharmacogenetics: study of genetically determined variations on cancer susceptibility due to xenobiotic exposure]. *Rev Med Chil* 2006 Apr;134(4):499-515.
- Ramis R, Vidal E, Garcia-Perez J, Lope V, Aragonés N, Perez-Gomez B, et al. Study of non-Hodgkin's lymphoma mortality associated with industrial pollution in Spain, using Poisson models. *BMC Public Health* 2009;9:26.
- Rao GN, Lassegue B, Griendling KK, Alexander RW. Hydrogen peroxide stimulates transcription of c-jun in vascular smooth muscle cells: role of arachidonic acid. *Oncogene* 1993 Oct;8(10):2759-64.
- Rao KS, Loeb LA. DNA damage and repair in brain: relationship to aging. *Mutat Res* 1992 Sep;275(3-6):317-29.
- Rebeck TR, Walker AH, Jaffe JM, White DL, Wein AJ, Malkowicz SB. Glutathione S-transferase-mu (GSTM1) and -theta (GSTT1) genotypes in the etiology of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999 Apr;8(4 Pt 1):283-7.
- Repetto M, Repetto Kuhn G, -libro C. *Toxicología fundamental* [. 4a. ed ed. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002 Apr 4;416(6880):552-6.
- Rollinson S, Roddam P, Kane E, Roman E, Cartwright R, Jack A, et al. Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukaemia. *Carcinogenesis* 2000 Jan;21(1):43-7.
- Ross D, Traver RD, Siegel D, Kuehl BL, Misra V, Rauth AM. A polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1): relationship of a homozygous mutation at position 609 of the NQO1 cDNA to NQO1 activity. *Br J Cancer* 1996 Sep;74(6):995-6.
- Ross D, Kupa JK, Winski SL, Beall HD, Anwar A, Siegel D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms. *Chem Biol Interact* 2000 Dec 1;129(1-2):77-97.
- Rosvold EA, McGlynn KA, Lustbader ED, Buetow KH. Identification of an NAD(P)H:quinone oxidoreductase polymorphism and its association with lung cancer and smoking. *Pharmacogenetics* 1995 Aug;5(4):199-206.

- Rothman N, Cantor KP, Blair A, Bush D, Brock JW, Helzlsouer K, et al. A nested case-control study of non-Hodgkin lymphoma and serum organochlorine residues. *Lancet* 1997 Jul 26;350(9073):240-4.
- Rouissi K, Bahria IB, Bougatef K, Marrakchi R, Stambouli N, Hamdi K, et al. The effect of tobacco, XPC, ERCC2 and ERCC5 genetic variants in bladder cancer development. *BMC Cancer* 2011;11:101.
- Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Briand M, Pottier D, Gauduchon P. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res* 2004 Mar 15;64(6):2264-9.
- Sagi J, Chenna A, Hang B, Singer B. A single cyclic p-benzoquinone adduct can destabilize a DNA oligonucleotide duplex. *Chem Res Toxicol* 1998 Apr;11(4):329-34.
- Saijo M, Takedachi A, Tanaka K. Nucleotide excision repair by mutant xeroderma pigmentosum group A (XPA) proteins with deficiency in interaction with RPA. *J Biol Chem* 2011 Feb 18;286(7):5476-83.
- Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 1996;65:43-81.
- Santella RM, Grinberg-Funes RA, Young TL, Dickey C, Singh VN, Wang LW, et al. Cigarette smoking related polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral mononuclear cells. *Carcinogenesis* 1992 Nov;13(11):2041-5.
- Sarasin A. Progress and prospects of xeroderma pigmentosum therapy. *Adv Exp Med Biol* 2008;637:144-51.
- Sarmanova J, Benesova K, Gut I, Nedelcheva-Kristensen V, Tynkova L, Soucek P. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Mol Genet* 2001 Jun 1;10(12):1265-73.
- Schaeffer L, Roy R, Humbert S, Moncollin V, Vermeulen W, Hoeijmakers JH, et al. DNA repair helicase: a component of BTF2 (TFIIH) basic transcription factor. *Science* 1993 Apr 2;260(5104):58-63.
- Scharer OD, Jiricny J. Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* 2001 Mar;23(3):270-81.
- Scharer OD. Hot topics in DNA repair: the molecular basis for different disease states caused by mutations in TFIIH and XPG. *DNA Repair (Amst)* 2008 Feb 1;7(2):339-44.
- Seidegard J, Pero RW. The genetic variation and the expression of human glutathione transferase mu. *Klin Wochenschr* 1988;66 Suppl 11:125-6.
- SEOM. *Sociedad Española de Oncología.- CIFRAS\_DE\_CANCER\_2013*. Sociedad Española de Oncología. 2013. Ref Type: Magazine Article
- Serrato M, Marian AJ. A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest* 1995 Dec;96(6):3005-8.
- Shadnia S, Azizi E, Hosseini R, Khoei S, Fouladdel S, Pajoumand A, et al. Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol* 2005 Sep;24(9):439-45.
- Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999 Nov;20(6):718-23.
- Shen M, Zheng T, Lan Q, Zhang Y, Zahm SH, Wang SS, et al. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin lymphoma among women in Connecticut. *Hum Genet* 2006 Jul;119(6):659-68.

- Shen M, Purdue MP, Krickler A, Lan Q, Grulich AE, Vajdic CM, et al. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. *Haematologica* 2007 Sep; 92(9):1180-5.
- Shenfield GM. Genetic polymorphisms, drug metabolism and drug concentrations. *Clin Biochem Rev* 2004;25(4):203-6.
- Sherratt PJ, Pulford DJ, Harrison DJ, Green T, Hayes JD. Evidence that human class Theta glutathione S-transferase T1-1 can catalyse the activation of dichloromethane, a liver and lung carcinogen in the mouse. Comparison of the tissue distribution of GST T1-1 with that of classes Alpha, Mu and Pi GST in human. *Biochem J* 1997 Sep 15;326 ( Pt 3):837-46.
- Siegel D, Ryder J, Ross D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 expression in human bone marrow endothelial cells. *Toxicol Lett* 2001 Dec 15;125(1-3):93-8.
- Silveira VS, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Tone LG. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. *Environ Mol Mutagen* 2010 Jan;51(1):48-56.
- Simeonova PP, Luster MI. Mechanisms of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms? *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000;19(3):281-6.
- Smith KR, Corvalan CF, Kjellstrom T. How much global ill health is attributable to environmental factors? *Epidemiology* 1999 Sep;10(5):573-84.
- Smith MT, Wang Y, Kane E, Rollinson S, Wiemels JL, Roman E, et al. Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood* 2001 Mar 1;97(5):1422-6.
- Stellman JM, McCann M, Warshaw L, Brabant C, Finklea J, España, et al. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. 3a. ed ed. Madrid: Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Subdirección General de Publicaciones.
- Stevens VL, Rodriguez C, Talbot JT, Pavluck AL, Thun MJ, Calle EE. Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms and prostate cancer in the CPS-II Nutrition Cohort. *Prostate* 2008 Sep 1;68(12):1336-40.
- Strange RC, Lear JT, Fryer AA. Polymorphism in glutathione S-transferase loci as a risk factor for common cancers. *Arch Toxicol Suppl* 1998;20:419-28.
- Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, et al. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 1998 Aug;2(2):223-32.
- Sunyaev S, Ramensky V, Bork P. Towards a structural basis of human non-synonymous single nucleotide polymorphisms. *Trends Genet* 2000 May;16(5):198-200.
- Suzuki T, Matsuo K, Hiraki A, Saito T, Sato S, Yatabe Y, et al. Impact of one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on risk of lung cancer in Japan: a case control study. *Carcinogenesis* 2007 Aug;28(8):1718-25.
- Tanaka K, Miura N, Satokata I, Miyamoto I, Yoshida MC, Satoh Y, et al. Analysis of a human DNA excision repair gene involved in group A xeroderma pigmentosum and containing a zinc-finger domain. *Nature* 1990 Nov 1;348(6296):73-6.
- Testa B, Krämer SD. *The biochemistry of drug metabolism*. Weinheim: Wiley; 2008.
- Tew KD, Manevich Y, Grek C, Xiong Y, Uys J, Townsend DM. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-

- glutathionylation in cancer. *Free Radic Biol Med* 2011 Jul 15;51(2):299-313.
- Thompson CL, Sancar A. Photolyase cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene* 2002 Dec 16;21(58):9043-56.
- Thompson PA, DeMarini DM, Kadlubar FF, McClure GY, Brooks LR, Green BL, et al. Evidence for the presence of mutagenic arylamines in human breast milk and DNA adducts in exfoliated breast ductal epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 2002;39(2-3):134-42.
- Tormo MJ, Navarro C. Mortalidad general por causas específicas e incidencia de cáncer en Cartagena y su comparación con la situación en otras áreas geográficas regionales. *Contaminacion Atmosferica y Salud en Cartagena- Consejería de Sanidad* 1991;71-9.
- Townsend D, Tew K. Cancer drugs, genetic variation and the glutathione-S-transferase gene family. *Am J Pharmacogenomics* 2003;3(3):157-72.
- Traver RD, Siegel D, Beall HD, Phillips RM, Gibson NW, Franklin WA, et al. Characterization of a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase (DT-diaphorase). *Br J Cancer* 1997;75(1):69-75.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 2006 Jun;64(2):178-89.
- Veglia F, Matullo G, Vineis P. Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003 Feb;12(2):157-60.
- Vermeulen W, de BJ, Citterio E, van Gool AJ, van der Horst GT, Jaspers NG, et al. Mammalian nucleotide excision repair and syndromes. *Biochem Soc Trans* 1997 Feb;25(1):309-15.
- Vijai J, Kirchhoff T, Schrader KA, Brown J, Dutra-Clarke AV, Manschreck C, et al. Susceptibility loci associated with specific and shared subtypes of lymphoid malignancies. *PLoS Genet* 2013;9(1):e1003220.
- Villanueva JR. La microbiología y el desarrollo biotecnológico en España. *Microbiologia* 2002 Jan 1.
- Vineis P, Pirastu R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* 1997 May;8(3):346-55.
- Vineis P. Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene* 2004 Aug 23;23(38):6477-83.
- Volker M, Mone MJ, Karmakar P, van HA, Schul W, Vermeulen W, et al. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 2001 Jul;8(1):213-24.
- Wakasugi M, Sancar A. Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 1999 Jun 25;274(26):18759-68.
- Wan J, Shi J, Hui L, Wu D, Jin X, Zhao N, et al. Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Environ Health Perspect* 2002 Dec;110(12):1213-8.
- Wang D, Zhu G, Huang X, Lippard SJ. X-ray structure and mechanism of RNA polymerase II stalled at an antineoplastic monofunctional platinum-DNA adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 May 25;107(21):9584-9.
- Wang F, He Y, Guo H, Li J, Yang Y, Wu Z, et al. Genetic variants of nucleotide excision repair genes are associated with DNA damage in coke oven workers. *Cancer*

- Epidemiol Biomarkers Prev 2010 Jan;19(1):211-8.
- Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. Hum Mol Genet 1993 Aug;2(8):1123-8.
- Weiner AS, Beresina OV, Voronina EN, Voropaeva EN, Boyarskih UA, Pospelova TI, et al. Polymorphisms in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma. Leuk Res 2011 Apr;35(4):508-15.
- Weinstein IB. The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture. Cancer Res 1988 Aug 1;48(15):4135-43.
- Weisburger JH. Causes of cancer and cancer prevention. Arch Geschwulstforsch 1990;60(5):385-99.
- Welsh MM, Karagas MR, Applebaum KM, Spencer SK, Perry AE, Nelson HH. A role for ultraviolet radiation immunosuppression in non-melanoma skin cancer as evidenced by gene-environment interactions. Carcinogenesis 2008 Oct;29(10):1950-4.
- Willemze R, Jaffe ES, Burg G, Cerroni L, Berti E, Swerdlow SH, et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. Blood 2005 May 15;105(10):3768-85.
- Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. Biochem J 1996 Jan 1;313 ( Pt 1):17-29.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA. Environmental and chemical carcinogenesis. Semin Cancer Biol 2004 Dec;14(6):473-86.
- Wolf CR, Smith CA, Forman D. Metabolic polymorphisms in carcinogen metabolising enzymes and cancer susceptibility. Br Med Bull 1994 Jul;50(3):718-31.
- World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. IARC Monographs 1988.
- Wu X, Zhao H, Wei Q, Amos CI, Zhang K, Guo Z, et al. XPA polymorphism associated with reduced lung cancer risk and a modulating effect on nucleotide excision repair capacity. Carcinogenesis 2003 Mar;24(3):505-9.
- Yamaguti GG, Lourenco GJ, Silveira VS, Tone LG, Lopes LF, Lima CS. Increased risk for acute lymphoblastic leukemia in children with cytochrome P450A1 (CYP1A1)- and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)-inherited gene variants. Acta Haematol 2010;124(3):182-4.
- Yang FY, Guan QK, Cui YH, Zhao ZQ, Rao W, Xi Z. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) genetic C609T polymorphism is associated with the risk of digestive tract cancer: a meta-analysis based on 21 case-control studies. Eur J Cancer Prev 2012 Sep;21(5):432-41.
- Yang K, Fang JL, Hemminki K. Abundant lipophilic DNA adducts in human tissues. Mutat Res 1998 Dec 3;422(2):285-95.
- Yokoi M, Masutani C, Maekawa T, Sugawara K, Ohkuma Y, Hanaoka F. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA. J Biol Chem 2000 Mar 31;275(13):9870-5.
- Yoon M, Ahn SH, Kim J, Shin DH, Park SY, Lee SB, et al. Radiation-induced cancers from modern radiotherapy techniques: intensity-modulated radiotherapy versus proton

therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010 Aug 1;77(5):1477-85.

Yu K, Zhang J, Zhang J, Dou C, Gu S, Xie Y, et al. Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Hum Genet* 2010 Mar;18(3):370-8.

Zhang FF, Terry MB, Hou L, Chen J, Lissowska J, Yeager M, et al. Genetic polymorphisms in folate metabolism and the risk of stomach cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007 Jan;16(1):115-21.

Zhang J, Yin L, Liang G, Liu R, Pu Y. Detection of quinone oxidoreductase 1 (NQO1) single-nucleotide polymorphisms (SNP) related to benzene metabolism in immortalized B lymphocytes from a Chinese Han population. *J Toxicol Environ Health A* 2010;73(7):490-8.

Zhou W, Thurston SW, Liu G, Xu LL, Miller DP, Wain JC, et al. The interaction between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001 May;10(5):461-6.

Zhu ML, Wang M, Cao ZG, He J, Shi TY, Xia KQ, et al. Association between the ERCC5 Asp1104His polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 2012;7(7):e36293.

Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997 May;18(5):869-82.



## Producción Científica derivada del Estudio EMUPOLIN.

### Tres artículos a revistas internacionales:

- Ruiz-Cosano J, Conesa-Zamora P, González-Conejero R, Pérez-Ceballos E, Martínez-Francés A, Vicente V, Pérez-Guillermo M. **“Role of GSTT1 and M1 null genotypes as risk factors for B-cell lymphoma: influence of geographical factors and occupational exposure.”** Mol Carcinog. 2012 Jun;51(6):508-13. Factor de Impacto: 4,2. (Incluido en el primer cuartil de las revistas de Oncología).

- Conesa-Zamora P\*, Ruiz-Cosano J\*, Torres-Moreno D, Español I, Gutiérrez-Meca MD, Trujillo-Santos J, Pérez-Ceballos E, González-Conejero R, Corral J, Vicente V, Pérez-Guillermo M. **“Polymorphisms in xenobiotic metabolizing genes (EPHX1, NQO1 and PON1) in lymphoma susceptibility: a case control study.”** BMC Cancer. 2013 May 7;13:228. Factor de Impacto: 3,33.

- Ruiz-Cosano J, Torres-Moreno D, Conesa-Zamora P. “Influence of polymorphisms in ERCC5, XPA and MTR DNA repair and synthesis genes in B-cell lymphoma risk. A case-control study in Spanish population.” J.BU.ON 2013 Factor de Impacto: 0,61.

### Publicaciones a Congresos Nacionales:

#### **XXVI Congreso Nacional de Genética Humana (Murcia-2011):**

- “Efecto del polimorfismo HIS1104ASP en el gen ERCC5 en la susceptibilidad a neoplasias de células B Maduras”
- “El genotipo “Null” en el gen GSTT1 está asociado con mayor riesgo al desarrollo de neoplasias de células B maduras”

#### **VI Congreso Nacional del laboratorio Clínico Barcelona 2012:**

- “Estandarización de una PCR-Multiplex para la determinación genética de dos polimorfismos genéticos (GSTT1 y GSTM1) de las enzimas glutatión transferasas en pacientes con enfermedades hematológicas de células B maduras”

# Role of *GSTT1* and *M1* Null Genotypes as Risk Factors for B-Cell Lymphoma: Influence of Geographical Factors and Occupational Exposure

Javier Ruiz-Cosano,<sup>1</sup> Pablo Conesa-Zamora,<sup>2\*</sup> Rocío González-Conejero,<sup>3</sup> Elena Pérez-Ceballos,<sup>4</sup> Antonio Martínez-Francés,<sup>5</sup> Vicente Vicente,<sup>4</sup> and Miguel Pérez-Guillermo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Analysis Department, Hospital Universitario Santa María del Rosell (HUSMR), Cartagena, Spain

<sup>2</sup>Molecular Pathology and Pharmacogenetic Group, Pathology Department, HUSMR, Cartagena, Spain

<sup>3</sup>Department of Medicine, Centro Regional de Hemodonación, Murcia, Spain

<sup>4</sup>Haematology Department, Hospital General Universitario Morales Meseguer (HGUMM), Murcia, Spain

<sup>5</sup>Haematology Department, HUSMR, Cartagena, Spain

The interrelationship between genetic susceptibility and carcinogenic exposure is important in the development of haematopoietic malignancies. Both factors need to be considered to enable assessment of disease risk associated with a given individual under certain environmental conditions. *GSTT1* and *GSTM1* are two genes whose proteins are involved in the detoxification of potential carcinogens. We have studied the prevalence of *GSTT1* and *GSTM1* null polymorphisms using a novel PCR multiplex protocol in a group of 158 patients with B-cell lymphoma (BCL, 138 with non-Hodgkin lymphoma and 20 with Hodgkin lymphoma) and 214 healthy controls. A questionnaire regarding occupational exposure and lifestyle factors was also completed by both groups. *GSTM1* null genotype showed no significant differences between patients and controls (46.9% and 55.6%, respectively). In contrast, *GSTT1* null genotype was observed in 25.3% of patients and 15.4% of controls ( $P = 0.013$ ; OR = 1.85; CI (95%):1.11–3.09), suggesting a role for the *GSTT1* null genotype in the development of BCL. This effect was even more evident in females (27.5% vs. 14%:  $P = 0.014$ ). No significant association was observed between *GST* genotypes and disease risk in relation to smoking or occupational exposure. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: *GSTT1*; *GSTM1*; polymorphism; lymphoma; susceptibility

## INTRODUCTION

The development of B-cell lymphoma (BCL) including Hodgkin's (HL) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is, to a great extent, the result of a combined effect of genetic susceptibility and environmental factors. Xenobiotic metabolizing enzymes play a role in the detoxification of potential carcinogens as well as endogenous compounds. Glutathione S-transferase family members including *GSTT1* and *GSTM1* are also involved in the conjugation of environmental pollutants such as polyaromatic hydrocarbons and certain antineoplastic drugs [1]. The null genotype in both *GSTT1* and *GSTM1* leads to a loss of the corresponding protein due to homozygous gene deletion. These genotypes have been extensively studied in cancer susceptibility and prognosis [2].

The relationship between *GST* null genotypes and lymphoma treatment-related adverse effects and prognosis has been investigated [3–5] and the few studies that have addressed their role in

lymphoma susceptibility have given conflicting results [1,6–13].

With respect to environmental exposure as a risk factor for BCL, a considerable body of evidence has demonstrated that pesticide exposure may increase the risk of NHL [14,15], whilst the association for chemical industry compounds remains controversial [16–18].

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Abbreviations: BCL, B-cell lymphoma; HL, Hodgkin's; NHL, non-Hodgkin's lymphoma.

Javier Ruiz-Cosano and Pablo Conesa-Zamora contributed equally to the work.

\*Correspondence to: Pathology Department, Santa María del Rosell University Hospital, Paseo Alfonso XIII, 61, 30203 Cartagena, Spain.

Received 30 November 2010; Revised 6 May 2011; Accepted 12 May 2011

DOI 10.1002/mc.20814

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

In order to identify risk factors for BCL, both genetic susceptibility and environmental carcinogen exposure must be considered. To our knowledge, no previous studies on BCL have analyzed these two genotypes considering different geographical and occupational exposures.

The aim of our work was to study the prevalence of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes in BCL patients and in healthy controls and, in particular, to correlate the genotype distribution with smoking and pollutant exposure in both groups, using information obtained from medical records and a detailed questionnaire.

## MATERIALS AND METHODS

### Patient Characteristics

Blood samples were obtained from 158 BCL Caucasian patients –138 NHL and 20 HL, residents of either Murcia or Cartagena, in the Southeast of Spain. Patients were diagnosed between 2004 and 2009 at HUSMR in Cartagena and Morales Meseguer University Hospital in Murcia. Data on gender, age and place of residence were obtained from medical records. Information from residential exposure could be obtained for the whole study population by searching in clinical registries since every individual has a “healthcare center” of reference according to the residence address. The control group comprised 214 unrelated Caucasian healthy blood donors matched for age, gender, and geographical location without a previous history of malignancy. The questionnaire included questions about former and current place of residence, smoking history, occupation, and exposure to chemical compounds and pesticides. Individuals who smoked every day more than five cigarettes for more than 5 yr were considered smokers. Informed consent was obtained from all subjects and the study was approved by the local Ethics Committee.

### Geographical Study Area

The geographical area under study included a specific zone (Escombreras’ Valley) with many chemical plants comprising one of the highest densities of heavy chemical industries in Spain [19–21] including an oil refinery, an electricity generating station using oil combustion, and production of nitrogen and phosphoric fertilizer, as well as a biodiesel factory and a zinc and sulfuric acid extraction plant. The valley and its surrounding areas were therefore declared a “polluted atmospheric zone” by the Spanish government in 1979 and are therefore subject to rigorous control and monitoring of atmospheric contaminants [21]. Previous studies have confirmed a higher cancer incidence in this area compared with both the national average and the neighboring municipalities

[22,23]. Exposure by residence was defined as living within the “polluted atmospheric zone” for 10 yr or more.

### Occupational Exposure

Occupational exposure was only considered relevant when individuals answered that they used or were exposed to chemical compounds on a daily basis (information obtained using the questionnaire) and belonged to the following activities: chemical industry (exposed to aromatic hydrocarbons or solvents), construction (in contact with paint, varnish, wood dust, plaster), agriculture (using pesticides and fertilizers on farms or in the countryside) and metallurgy (welders, blacksmiths, panel beaters, and shipyard workers).

### DNA Extraction and GSTs Genotyping

Total genomic DNA was obtained from blood samples using the automatic DNA extraction system Maxwell 16 and DNA extraction kit for blood samples (cat: AS1010) (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer’s instructions. DNA was quantified by UV absorbance using the Bio-photometer by Eppendorf (Hilden, Germany).

*GSTT1* and *GSTM1* null genotypes were determined by a novel multiplex PCR protocol which included beta-globin as internal control. *GSTT1*, *GSTM1*, and *beta-globin* genomic loci were amplified from 100 ng of DNA in a total volume of 10  $\mu$ l containing 3.75 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM dNTPs, 0.5 U of Taq polymerase and 2 pmol of each of the following primers: *GSTT1*-fw (ATCTGTGGTCCC-CAAATCAG), *GSTT1*-rv (TTGGCCTTCAGAATGAC-CTC), *GSTM1*-fw (CTC CAT AAC ACG TGA AGC AAA AC), *GSTM1*-rv (CAG GAG AAA CTG AAG CCA AAG T), *beta-globin*-fw (GAAGAGCCAAGG-CAGTTACGG) *beta-globin*-rv (CAACTTCATCCAC-GTTCACCTT). MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Go Taq Flexi polymerase, and Go Taq buffer were purchased from Promega. The PCR program was as follows: initial denaturation at 95°C for 2 min, 10 cycles of 94°C 15 s, 58°C 15 s and 72°C 20 s, 24 cycles of 94°C 15 s, 61°C 15 s and 72°C 20 s and a final extension step of 3 min at 72°C.

Amplicon sizes were 205 bp for *GSTT1*, 156 bp for *GSTM1* and 268 bp for *beta-globin*. Null genotypes were evidenced by absence of *GSTT1* and/or *GSTM1* amplicons in the presence of *beta-globin* amplification. DNA fragments were visualized by electrophoresis with comparable feasibility using either 2% low-melting agarose or the QiAxcell high resolution DNA separation matrix (cat 929002) and QiAxcell device (Qiagen, Hilden, Germany) (Figure 1). PCR products were confirmed by direct sequencing using ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences obtained were compared to NCBI

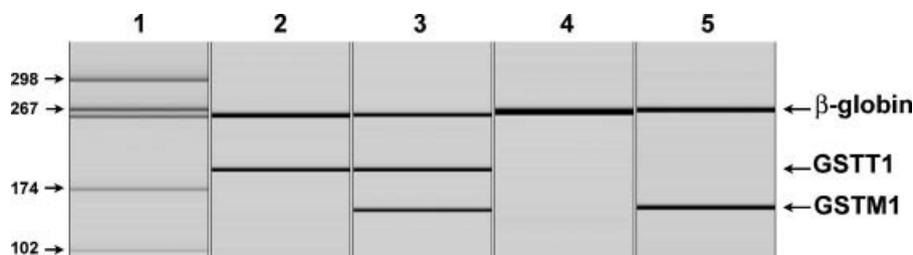


Figure 1. *GSTT1* and *GSTM1* genotyping by multiplex PCR and electrophoresis. Lane 1: Marker pUC18, Qiagen, 2: *GSTT1* plus/*GSTM1* null, 3: *GSTT1* plus/*GSTM1* plus, 4: *GSTT1* null/*GSTM1* null, 5: *GSTT1* null/*GSTM1* plus.

database using Blast application (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Statistical Analysis

Sample size reached in our series was optimum according to the sample size estimation for a gene-only study obtained with Quanto v.1.2 program (University of Southern California) [24] based on similar previous studies for OR estimation [12,13]. Statistical analysis was performed using the SPSS computer program Version 15.0 (Chicago, IL). Student's *t*-test was used to compare mean age of cases and controls. In order to evaluate statistical significance of genotype distribution in cases and controls and to test whether both genotypes were interrelated, Fisher's exact test and Pearson's  $\chi^2$  were applied.

RESULTS

The main features of patients and controls, as well as the questionnaire response rate, are shown in Table 1. No significant differences were observed between patients and controls in terms of age, gender, and exposure. The majority of exposed individuals worked in chemical industries (54%) followed by construction (22%), agriculture (16%), and metallurgy (8%). Eighty-five percent of the study population had not changed his status of residential exposure in the last 20 yr. No significant differences were observed between cases and controls when considering the type of occupational activity (data not shown).

Genotyping was successfully performed on all study subjects. No apparent relationship between

the occurrence of *GSTT1* and *GSTM1* genotypes was found in the whole study population ( $P = 0.478$ ; data not shown) but in the patient group, *GSTM1* null carriers were more often *GSTT1* plus than *GSTT1* null (54/71: 76.1% vs. 17/71: 23.9%) although this difference was not statistically significant ( $P = 0.432$ ).

No significant differences were observed for *GSTM1* genotype between cases and controls though a tendency was observed for a higher frequency of *GSTM1* plus in cases ( $P = 0.042$ ). Moreover, no relevant association was identified for the *GSTM1* genotype and the different type of exposure (Table 2). In contrast, the frequency of *GSTT1* null genotype was higher in patients than in controls (25.3% vs. 15.4%, respectively;  $P = 0.018$ ; OR = 1.86; 95%CI: 1.11–3.11). This difference was more pronounced in females (27.2% vs. 14.0%,  $P = 0.019$ ; OR = 2.28; 95%CI: 1.11–4.69). No significant associations were found between *GST* null genotypes and an increased risk of BCL in smokers or in those exposed to residential or occupational pollutants (Table 2).

We also evaluated the role of these genotypes restricting the analysis to NHL. No differences between NHL cases and controls were observed for the demographic and chemical exposure features (data not shown). Similar to BCL, *GSTT1* null was more frequent in NHL patients than in controls ( $P = 0.033$ ; OR = 1.72; 95%CI: 1.01–2.94) and, at a tendency level, in females ( $P = 0.047$ ). In contrast, *GSTM1* plus was more frequent in males with NHL ( $P = 0.035$ ; OR = 0.53; 95%CI: 0.28–1.00). No significant associations were observed between HNL and control considering the different kind of

Table 1. Demographic Features and Chemical Exposure of Cases and Controls

	n	Questionnaire response rate (%)	Age (SD)	Female, n (%)	Smoker, n (%)	Residential-E, n (%)	Occupational-E, n (%)
Cases	158	64.5	52.5 (15.6)	81 (51.3)	48/102 (47.1)	47/158 (29.7)	23/102 (22.5)
Controls	214	78.5	54.0 (8.4)	114 (53.3)	68/168 (40.5)	47/214 (22.0)	27/168 (16.1)
<i>P</i>			0.234	0.702	0.289	0.087	0.184
Total	372	72.6	53.5 (5.6)	195	116/270	94/372	51/283

Residential-E, residential exposure; Occupational-E, occupational exposure.

Table 2. *GSTT1* and *GSTM1* Genotype Distributions in BCL According to Gender and Exposure

	GSTT1		GSTM1	
	Null	Plus	Null	Plus
Total				
Cases	40 (25.3)	118 (74.7)	71 (44.9)	87 (55.1)
Controls	33 (15.4)	181 (84.6)	119 (55.6)	95 (44.4)
<i>P</i> (OR; 95%CI)		0.018 (1.86; 1.11–3.11)		0.042 (0.65; 0.43–0.99)
Female				
Cases	22 (27.2)	59 (72.8)	39 (48.1)	42 (51.9)
Controls	16 (14.0)	98 (86.0)	64 (56.1)	50 (43.9)
<i>P</i> (OR; 95%CI)		0.019 (2.28; 1.11–4.69)		0.170 (0.72; 0.41–1.28)
Male				
Cases	18 (23.4)	59 (76.6)	32 (41.6)	45 (58.4)
Controls	17 (17.0)	83 (83.0)	55 (55.0)	45 (45.0)
<i>P</i> (OR; 95%CI)		0.193 (1.49; 0.71–3.12)		0.076 (0.58; 0.32–1.06)
Smokers				
Cases	10 (20.4)	39 (79.6)	22 (44.9)	27 (55.1)
Controls	12 (17.6)	56 (82.4)	37 (54.4)	31 (45.6)
<i>P</i> (OR; 95%CI)		0.442 (1.19; 0.47–3.04)		0.204 (0.68; 0.32–1.42)
Residential exp				
Cases	15 (31.9)	32 (68.1)	19 (40.4)	28 (59.6)
Controls	9 (19.1)	38 (80.9)	26 (55.3)	21 (44.7)
<i>P</i> (OR; 95%CI)		0.118 (1.98; 0.76–5.12)		0.108 (0.54; 0.24–1.24)
Occupational exp				
Cases	6 (26.1)	17 (73.9)	11 (47.8)	12 (52.2)
Controls	7 (25.9)	20 (74.1)	16 (59.3)	11 (40.7)
<i>P</i> (OR; 95%CI)		0.62 (1.00; 0.28–3.58)		0.300 (0.63; 0.18–1.78)

Exp, exposure.

exposure (Table S1). In order to investigate whether *GSTT1* genotype had an effect amongst cases we compared cases (BCL and NHL) with or without exposure according to their *GSTT1* status and we did not find significant differences. Similar results were obtained amongst controls (Table S2).

When considering HL a higher percentage of *GSTT1* null was also observed in cases compared to controls (7/20: 35% vs. 15.4%;  $P = 0.035$ ; OR = 3.0; 95%CI: 1.15–7.91). No significant differences were observed for *GSTM1* null in these cases (8/20: 40.0% vs. 55.6%;  $P = 0.135$ ). In contrast, when restricting the analysis to follicular lymphoma *GSTM1* null was more often found in patients than controls (36/91: 39.6% vs. 55.6%;  $P = 0.007$ ; OR = 0.53, 96%CI: 0.32–0.86). No relevant associations were observed for both genotypes when restricting the analysis to diffuse large BCL cases (data not shown).

#### DISCUSSION

A significant association is observed between the risk of cancer development and xenobiotic metabolism enzyme gene polymorphism. GST enzymes, encoded by *GST* genes, are responsible for the detoxification of chemicals found in the environment and naturally synthesized metabolites, and

they play an important role in protecting tissue from oxidative damage. *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes result in either total absence or a substantial change in enzyme activity [25,26]. Accordingly, these polymorphisms have been linked to cancer susceptibility in several studies [2,27–29] but few have examined their role in lymphoma [1,6–8].

On the other hand, conflicting results have been reported concerning the role of exposure to chemical compounds and BCL development [16–18]. We therefore decided to study the *GSTT1* and *GSTM1* genotype distribution in BCL patients and controls and, in particular, to correlate these genotypes with pollutant exposure.

A novel multiplex PCR protocol for simultaneous detection of *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes has been described here and the procedure has the advantage of the internal control amplicon (beta-globin in this case) being larger than that of *GSTT1* and *GSTM1*. Besides, amplicons are less than 300 bp and the difference in sizes are sufficient to obtain clear band separation thus facilitating the performance and evaluation of this analysis. To our knowledge, in most of GST multiplex protocols and in all previous lymphoma susceptibility studies, the *GSTT1* amplicon was larger than the internal control [1,7,8,12,13,27–29]. This

has the disadvantage that, in specimens where DNA quality is defective, false positive results may be obtained when the PCR is able to amplify the internal control but not the *GSTT1* amplicon due to DNA degradation, reducing the reliability of the results obtained in these studies. In fact, high ORs (4.3 and 11.9) have been obtained for *GSTT1* null genotype in two independent studies using tissue specimens of lymph nodes and bone marrow biopsies, some of them paraffin embedded, and this latter procedure has made it more difficult to achieve high quality DNA extraction [7,12]. Moreover, the use of cancer tissue [7,12] is not recommended for genetic susceptibility studies because of possible allelic somatic losses produced during the carcinogenic process.

Previous reports on the role of *GST* polymorphisms in lymphoma risk have given conflicting results, particularly concerning the role of *GSTT1* null genotype. Two studies reported no effect of *GSTT1* null genotype on lymphoma risk [6,8], whereas three showed positive associations of this genotype with lymphoma development with ORs of 1.9 for HL, 4.3 for NHL and 11.9 for DLBCL patients [1,7,12].

Our results also support an association between *GSTT1* null and an increase in BCL susceptibility. The ORs for BCL (1.86), NHL (1.72), and HL (3.0) were comparable with that reported by Hohaus et al. [1] in HL (1.9). Interestingly, in both studies, the relationship was more pronounced in females, suggesting a gender-associated, gene-environment interaction which warrants further investigation. Of possible relevance here is a report that hair-dye use has been associated with an increased risk of NHL [30]. It is important to mention that given the small sample size the results obtained for HL cases ( $n = 20$ ) in our study must be taken with caution.

As with previous studies [1,7,8], we did not detect an increased risk of BCL in *GSTM1* null carriers. On the contrary, a protective role of *GSTM1* null genotype for the development BCL in general, and FL in particular, seems likely. This effect may be due to the fact that most *GSTM1* null patients are *GSTT1* plus, thus compensating for the absence of the *GSTM1* gene. This finding highlights the importance of *GSTT1* compared to *GSTM1* in the carcinogenic process though confirmation in larger studies is required. Given that *GST* enzymes are implicated in the metabolism of xenotoxics, we decided to evaluate the effect of *GSTT1* and *GSTM1* null genotypes in MBCM development considering exposure to chemical compounds. We did not observe an association between smoking or occupational exposure to chemical compounds and an increased risk of BCL and these results are consistent with previous studies which have demonstrated that exposure to industrial pollution is

not a major aetiological factor for lymphoma [22,31]. Since the sample size of our study was relatively small, this issue was addressed by evaluating the effect of these null genotypes separately according to smoking habit, geographical and occupational exposure. The effect of pesticides with a known causative role in lymphomagenesis [14,15] was difficult to assess given the small percentage of subjects exposed to these compounds in our series. We found no significant differences in *GST* null genotypes between exposed cases and controls suggesting that the association observed in the whole series between *GSTT1* null and cases was independent of chemical exposure. Furthermore, we observed that the exposed cases showed similar frequency of *GSTT1* null than nonexposed cases.

In conclusion, our results have shown a role for the *GSTT1* null genotype as a risk factor for BCL. This effect was particularly prominent in females whereas smoking habit and occupational exposure to chemical compounds did not appear to be involved in the carcinogenic process.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Javier Corral from Centro Regional de Hemodonación from Murcia Region for his contribution to the early stages of the study and his critical revision of the manuscript and to Mike Tobin for reviewing the English version. This work was funded by Fundación CajaMurcia (project reference: CM/12/08), Murcia, Spain.

#### REFERENCES

- Hohaus S, Massini G, D'Alo' F, et al. Association between glutathione S-transferase genotypes and Hodgkin's lymphoma risk and prognosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:3435-3440.
- Mcllwain CC, Townsend DM, Tew KD. Glutathione S-transferase polymorphisms: Cancer incidence and therapy. *Oncogene* 2006;25:1639-1648.
- Hohaus S, Mansueto G, Massini G, et al. Glutathione-S-transferase genotypes influence prognosis in follicular non-Hodgkin's Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2007;48:564-569.
- Hohaus S, Di Ruscio A, Di Febo A, et al. Glutathione S-transferase P1 genotype and prognosis in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2005;11:2175-2179.
- Mertens AC, Mitby PA, Radloff G, et al. XRCC1 and glutathione-S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to radiotherapy-related malignancies in survivors of Hodgkin disease. *Cancer* 2004;101:1463-1472.
- Chiu BC, Kolar C, Gapstur SM, et al. Association of NAT and GST polymorphisms with non-Hodgkin's lymphoma: A population-based case-control study. *Br J Haematol* 2005;128:610-615.
- Kerridge I, Lincz L, Scorgie F, et al. Association between xenobiotic gene polymorphisms and non-Hodgkin's lymphoma risk. *Br J Haematol* 2002;118:477-481.
- Sarmanova J, Benesova K, Gut I, et al. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Mol Genet* 2001;10:1265-1273.

9. Rollinson S, Levene AP, Mensah FK, et al. Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. *Blood* 2003;102:1007–1011.
10. Soucek P, Sarmanová J, Kristensen VN, et al. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Int Arch Occup Environ Health* 2002;75:S86–S92.
11. Lemos MC, Cabrita FJ, Silva HA, et al. Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to haematological neoplasias. *Carcinogenesis* 1999;20:1225–1229.
12. Al-Dayel F, Al-Rasheed M, Ibrahim M, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP1A1, GSTT and GSTP contribute to the development of diffuse large B-cell lymphoma risk in the Saudi Arabian population. *Leuk Lymphoma* 2008;49:122–129.
13. Dieckvoss BO, Stanulla M, Schrappe M, et al. Polymorphisms within glutathione S-transferase genes in pediatric non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2002;87:709–713.
14. Fritschi L, Benke G, Hughes AM, et al. Occupational exposure to pesticides and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol* 2005;162:849–857.
15. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, et al. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res* 2004;64:2264–2269.
16. Wong O, Fue H. Exposure to benzene and non-Hodgkin lymphoma, an epidemiologic overview and an ongoing case-control study in Shanghai. *Chem Biol Interact* 2005;153–154:33–41.
17. Fritschi L, Benke G, Hughes AM, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with occupational exposure to solvents, metals, organic dusts and PCBs (Australia). *Cancer Causes Control* 2005;16:599–607.
18. Lamm SH, Engel A, Byrd DM. Non-Hodgkin lymphoma and benzene exposure: A systematic literature review. *Chem Biol Interact* 2005;153–154:231–237.
19. García-Pérez J, Boldo E, Ramis R, et al. Description of industrial pollution in Spain. *BMC Public Health* 2007;7:40.
20. Cirera L, Rodríguez M, Giménez J, et al. Effects of public health interventions on industrial emissions and ambient air in Cartagena, Spain. *Environ Sci Pollut Res Int* 2009;16:152–161.
21. Real Decreto 1197/1979 de 20 de Febrero, por el que se declara aplicable a parte del término municipal de Cartagena (Murcia) las medidas y beneficios previstos en la Ley 38/1972 de Diciembre, y Reglamentación complementaria de protección del ambiente atmosférico. Spanish Government Official Bulletin (BOE) 1979; 123:11406.
22. López-Abente G, Hernández-Barrera V, Pollán M, et al. Municipal pleural cancer mortality in Spain. *Occup Environ Med* 2005;62:195–199.
23. Lopez-Abente G, Aragones N, Ramis R, et al. Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: Possible role of mining and industry. *BMC Public Health* 2006;6:17.
24. Gauderman WJ, Morrison JM. QUANTO 1.1: A Computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies, <http://hydra.usc.edu/gxe>. 2006.
25. Zhong S, Howie AF, Ketterer B, et al. Glutathione S-transferase mu locus: Use of genotyping and phenotyping assays to assess association with lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 1991;12:1533–1537.
26. Warholm M, Rane A, Alexandrie AK, et al. Genotypic and phenotypic determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics* 1995;5:252–254.
27. Ueda M, Hung YC, Terai Y, et al. Glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and p53 codon 72 polymorphisms in human tumor cells. *Hum Cell* 2003;16:241–251.
28. Chen CL, Liu Q, Pui CH, et al. Higher frequency of glutathione S-transferase deletions in black children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;89:1701–1707.
29. Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2000;6:4091–4095.
30. Zhang Y, Sanjose SD, Bracci PM, et al. Personal use of hair dye and the risk of certain subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Am J Epidemiol* 2008;167:1321–1331.
31. Ramis R, Vidal E, García-Pérez J, et al. Study of non-Hodgkin's lymphoma mortality associated with industrial pollution in Spain, using Poisson models. *BMC Public Health* 2009;9:26.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Polymorphisms in xenobiotic metabolizing genes (*EPHX1*, *NQO1* and *PON1*) in lymphoma susceptibility: a case control study

Pablo Conesa-Zamora<sup>1\*†</sup>, Javier Ruiz-Cosano<sup>1†</sup>, Daniel Torres-Moreno<sup>1</sup>, Ignacio Español<sup>2</sup>, María D Gutiérrez-Meca<sup>2</sup>, Javier Trujillo-Santos<sup>3</sup>, Elena Pérez-Ceballos<sup>4</sup>, Rocío González-Conejero<sup>5</sup>, Javier Corral<sup>5</sup>, Vicente Vicente<sup>4</sup> and Miguel Pérez-Guillermo<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** The interplay between genetic susceptibility and carcinogenic exposure is important in the development of haematopoietic malignancies. *EPHX1*, *NQO1* and *PON1* are three genes encoding proteins directly involved in the detoxification of potential carcinogens.

**Methods:** We have studied the prevalence of three functional polymorphisms affecting these genes rs1051740 *EPHX1*, rs1800566 *NQO1* and rs662 *PON1* in 215 patients with lymphoma and 214 healthy controls.

**Results:** Genotype frequencies for *EPHX1* and *NQO1* polymorphisms did not show any correlation with disease. In contrast, the GG genotype in the *PON1* polymorphism was found to be strongly associated with the disease (15.3% vs. 4.7%; OR = 3.7 CI (95%): 1.8-7.7;  $p < 0.001$ ). According to the pathological diagnosis this association was related to follicular ( $p = 0.004$ ) and diffuse large B-cell ( $p = 0.016$ ) lymphomas.

**Conclusions:** Despite the fact that further confirmation is needed, this study shows that the *PON1* GG genotype in rs662 polymorphism could be a risk factor for B-cell lymphomas.

**Keywords:** *PON1*, *NQO1*, *EPHX1*, Polymorphism, SNP, Lymphoma, Susceptibility

## Background

The development of lymphomas including Hodgkin's (HL) and non-Hodgkin's lymphoma (NHL) is, to a great extent, the result of a combined effect of genetic susceptibility and environmental factors. Xenobiotic metabolizing enzymes, such as *EPHX1*, *NQO1* and *PON1*, play a role in the detoxification of potential carcinogens from chemical industries as well as endogenous compounds [1,2]. Although a considerable body of evidence has demonstrated that pesticide exposure may increase the risk of NHL [3,4], the association for chemical industry compounds as a risk factor for B-cell lymphoma remains controversial [5-7]. Polymorphisms in the genes coding

these enzymes can be responsible for different susceptibilities to lymphoma development [8-10].

To our knowledge, few studies have analysed polymorphisms in genes coding for xenobiotic metabolism enzymes (such as *EPHX1*, *NQO1* and *PON1*) in lymphoma [11] or leukemia [12,13]. The aim of our work was to study the genotype distribution of three missense single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs1051740, rs1800566 and rs662, respectively) in these genes in lymphoma patients and in healthy controls.

## Methods

### Study subjects

Blood samples were obtained from 215 lymphoma Caucasian patients –194 NHL and 21 HL residents of either Murcia or Cartagena, in the Southeast of Spain. Lymphoma classification and diagnose was based in the 2008 World Health Organization classification of lymphoma [14]. Our study subjects come largely from a previous

\* Correspondence: pablo.conesa@carm.es

†Equal contributors

<sup>1</sup>Molecular Pathology and Pharmacogenetic Group, Pathology Department, Santa Lucía General University Hospital (HGUSL), 30202, Cartagena, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

described series of patients diagnosed between 2004 and 2010 at the HUSMR in Cartagena (n = 116) and Morales Meseguer University Hospital (HUMM) (n = 42) in Murcia [15]. The rest of participants included in the study cases (n = 57) were those diagnosed during 2011 who accepted participation in the study. All patients from the HUMM institution were follicular lymphoma (FL) and, for this reason, most of the patients included in this study (135/215) belonged to this type of lymphoma on the basis of the availability of DNA specimens from a previous study. Data on gender, age and place of residence were obtained from medical records. The control group comprised 214 unrelated Caucasian healthy blood donors matched for age, gender and geographical location without a previous history of malignancy, as previously described [15]. Informed consent was obtained from all subjects. The research was carried out in compliance with the Helsinki Declaration and the study was approved by the local Ethics Committee of both HUSMR and HUMM participating hospitals.

#### Geographical study area

The geographical area under study included a specific zone (Escombreras' Valley) with many chemical plants comprising one of the highest densities of heavy chemical industries in Spain [16-18] including an oil refinery, an electricity generating station using oil combustion, a combined cycle gas turbine, and a manufacturing plant for production of nitrogen and phosphoric fertilizers, as well as a biodiesel factory and a zinc and sulphuric acid extraction plant. The valley and its surrounding areas were therefore declared a "polluted atmospheric zone" by the Spanish government in 1979 and are therefore subjected to rigorous control and monitoring of atmospheric contaminants [18]. In fact, nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) as NO<sub>2</sub>, sulfurdioxide (SO<sub>2</sub>), chlorine (ClH) volatile organic compounds (VOCs) as benzene and mercaptans and particulate matter smaller than 10 microns (PM<sub>10</sub>) were amongst the most common pollutants in that area. Previous studies have confirmed a higher cancer incidence in this area compared with both the national average and the neighbouring municipalities [19,20].

#### DNA extraction and genotyping

Total genomic DNA was obtained from blood samples using the automatic DNA extraction system Maxwell 16 and DNA extraction kit for blood samples (cat: AS1010) (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified by UV absorbance using the Biophotometer by Eppendorf (Hilden, Germany).

*NQO1* and *PON1* polymorphisms were determined by allelic discrimination using TaqMan probes and a 7500 F real-time PCR thermocycler both provided by Applied

Biosystems (Foster City, CA). For the *EPHX* polymorphism we used the amplifluor SNPs genotyping system (Millipore, Darmstadt, Germany).

#### Statistical analysis

Sample size reached in our series was optimum according to the sample size estimation for a gene-only study obtained with Quanto v.1.2 program (University of Southern California) [21]. Statistical analysis was performed using the SPSS computer program Version 15.0 (Chicago, Illinois, USA). Student's *t*-test was used to compare mean age of cases and controls and Yeats-corrected Pearson  $\chi^2$  test was used to evaluate statistical significance of genotype distribution in cases and controls. Given that xenobiotic metabolizing enzymes would behave as possible tumor suppressor by eliminating potential carcinogens, a recessive model for the p-value calculation was preferred, however the main results were also studied following dominant and co-dominant models. Hardy-Weinberg, linkage disequilibrium (LD) and joint effect analyses of the studied polymorphisms were performed using the online program Shesis Page (<http://analysis2.bio-x.cn/myAnalysis.php>) [22].

#### Results

The main demographical features of patients and controls are shown in Table 1. No significant differences were observed between patients and controls in terms of age and gender.

Genotyping was successfully performed on all study subjects except for nine cases which could not be genotyped for *EPHX* and two for *NQO1*. The genotype frequencies in the study population were *EPHX1*: TT 54.8%, TC 36.7%, CC 8.5%; *NQO1*: CC 59.5%, CT 35.0%, TT 5.4% and *PON1*: AA 42.7%, AG 47.3%, GG 10.0%, consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium (p = 0.187, 0.892 and 0.228, respectively) and similar to the HapMap-CEU (European) frequencies (*EPHX1*: TT 46.4%, TC 41.1%, CC 12.5%; *NQO1*: CC 60.0%, CT 36.7%, TT 5.8% and *PON1*: AA 43.4%, AG 46.9%, GG 9.7%; [<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>]).

No significant differences were observed for the rs1800566 and rs1051740 polymorphisms in the *NQO1* and *EPHX*, respectively. In contrast, the GG genotype in the rs662 *PON1* polymorphism was associated with lymphoma development (15.3% vs. 4.7%; OR = 3.7 CI

**Table 1 Demographic features of cases and controls**

	n	Age (SD)	Female n (%)
Cases	215	53.8 (15.2)	102 (47.4)
Controls	214	53.9 (8.4)	114 (53.3)
P		0.933	0.227
total	429	53.8 (12.8)	216 (50.3)

(95%): 1.8-7.7;  $p < 0.001$ ) (Table 2). The differences between cases and controls were also significant when considering allelic distributions (G: 165 (38.4%) vs. 124 (29.0%), respectively).

The association of rs662 with lymphoma was also obtained when applying the co-dominant model in the whole study population ( $p = 0.0009$ ). When restricting for males and females  $p$  values were 0.016 and 0.054, respectively. However, no significant differences were obtained when the dominant model was used for any of the polymorphisms (data not shown).

As shown in Table 3, FL and diffuse large B-cell (DLBCL) lymphoma cases were more frequently GG carriers than controls. In contrast, HL cases did not show this association.

In order to ascertain the possible combined effect of the genotypes a joint effect analysis was performed and showed that the only significant combination was T-C-G for EPHX1, NQO1 and PON1 polymorphism, respectively rendering an OR of 1.73 (95% CI: 1.22-2.45;  $p = 0.002$ ) (Table 4). As expected,  $D'$  ( $< 0.21$ ) and  $r^2$  ( $< 0.008$ ) demonstrated that the polymorphisms studied were not in linkage disequilibrium.

## Discussion

Xenobiotic metabolising enzymes, such as EPHX1, NQO1 and PON1 play important roles in the detoxification of potential carcinogenic compounds. In fact, a plethora of studies have reported associations between polymorphisms in genes coding these enzymes and the risk of cancer development [8-10].

Epoxide hydrolase 1, encoded by *EPHX1* a gene located in 1q42.1, plays an important role in both the activation and detoxification of exogenous chemicals such as polycyclic aromatic hydrocarbons. Using *in vitro* expression studies Hassett et al. described that the substitution of His113 for the more commonly occurring Tyr113 residue in exon 3 decreased EPHX activity approximately

40% [23]. This single nucleotide polymorphism (SNP) (rs1051740) may play a role for genetic susceptibility to childhood leukemia [24,25] and to lymphoma in males [10] whilst other studies have not found an association with susceptibility [26] and outcome [27] in leukemia. A recent study carried out the genotyping of 1,115 women (518 NHL and 597 controls) for six polymorphisms in genes involved in solvent metabolism (including EPHX1 rs1051740 and NQO1 rs1800566, but not PON1 rs662). In those women, different solvent exposures were measured, and some association was found between EPHX1 rs2234922 and DLBCL with a pattern of interaction with benzene exposure [11].

NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1, a 2-electron reductase encoded by *NQO1* located in 16q22.1, detoxifies quinones derived from the oxidation of phenolic metabolites of benzene. The rs1800566 polymorphism consists of a C-to-T substitution at position 609, which codes for a Pro-to-Ser change at residue 187 (P187S). Exposition of wild type human bone marrow cells to hydroquinone (HQ) trigger an increase of NQO1 protein and activity, not induced in TT carriers [28]. Moreover, individuals homozygous for the TT genotype have an increased risk of benzene hematotoxicity and secondary cancers including leukaemia [29]. Some authors did find an association between this polymorphism and leukemia susceptibility [25,30,31] and outcome [27,32] whereas other studies, that included a meta-analysis, did not observed such an association [33-35].

Paraoxonase 1, encoded by *PON1* a gene located in 7q21.3, hydrolyzes the toxic oxon metabolites of several organophosphorous insecticides, as well as nerve agents, aromatic esters and a variety of aromatic and aliphatic lactones [36]. The *PON1* rs662 polymorphism consists of an A-to-G substitution that causes a Gln-to-Arg change at residue 192 (Q192R). Humbert et al. found that the allele encoding arginine has high-activity plasma paraoxonase, whereas glutamine at this position specifies a low-activity

**Table 2 EPHX1 (rs1051740), NQO1 (rs1800566) and PON1 (rs662) genotype distributions according to gender**

		EPHX1 (rs1051740)			NQO1 (rs1800566)			PON1 (rs662)		
		TT	CT	CC	CC	CT	TT	AA	AG	GG
Total	Cases	118 (57.3)	71 (34.5)	17 (8.2)	131 (61.5)	72 (33.8)	10 (4.7)	83 (38.6)	99 (46.0)	33 (15.3)
	Controls	113 (52.8)	83 (38.8)	18 (8.4)	123 (57.5)	78 (36.4)	13 (6.0)	100 (46.7)	104 (48.6)	10 (4.7)
	p (OR; 95% CI)	0.953 (1.0;0.5-2.0)			0.677 (0.8;0.3-1.8)			0.0004 (3.7;1.8-7.7)		
Female	Cases	57 (58.2)	36 (36.7)	5 (5.1)	63 (61.2)	34 (33.0)	6 (5.8)	42 (41.2)	47 (46.1)	13 (12.7)
	Controls	61 (53.5)	44 (38.6)	9 (7.9)	64 (56.1)	42 (36.8)	8 (7.0)	59 (51.8)	50 (43.9)	5 (4.4)
	p (OR; 95% CI)	0.590 (0.6;0.2-1.9)			0.936 (0.8;0.3-2.4)			0.05 (3.2;1.1-9.3)		
Male	Cases	61 (56.5)	34 (31.5)	13 (12.0)	68 (61.8)	38 (35.4)	4 (3.6)	41 (36.6)	52 (46.0)	20 (17.7)
	Controls	52 (52.0)	39 (39.0)	9 (9.0)	59 (59.0)	36 (36.0)	5 (5.0)	41 (41.0)	54 (54.0)	5 (5.0)
	p (OR; 95% CI)	0.627 (1.4;0.6-3.4)			0.884 (0.7;0.2-2.7)			0.008 (4.1;1.5-11.3)		

NA: not applicable.

The p-value calculated using the recessive model.

**Table 3 EPHX1 (rs1051740), NQO1 (rs1800566) and PON1 (rs662) genotype distributions according to the lymphoma diagnose**

	EPHX1 (rs1051740)			NQO1 (rs1800566)			PON1 (rs662)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	AA	AG	GG
<b>Controls</b>	113 (52.8)	83 (38.8)	18 (8.4)	123 (57.5)	78 (36.4)	13 (6.0)	100 (46.7)	104 (48.6)	10 (4.7)
<b>NHL</b>	109 (58.6)	65 (34.9)	12 (6.5)	122 (63.2)	63 (32.6)	8 (4.1)	76 (39.2)	88 (45.4)	30 (15.5)
<b>p (OR; 95% CI)</b>	0.458 (0.8;0.4-1.6)			0.513 (0.7;0.3-1.6)			<b>0.0005 (3.7;1.8-7.9)</b>		
<b>FL</b>	78 (59.5)	46 (35.1)	7 (5.3)	85 (63.0)	45 (33.3)	5 (3.7)	55 (40.7)	61 (45.2)	19 (14.1)
<b>p (OR; 95% CI)</b>	0.394 (0.6;0.2-1.5)			0.467 (0.6;0.2-1.7)			<b>0.004 (3.3;1.5-7.4)</b>		
<b>DLBCL</b>	21 (61.8)	10 (29.4)	3 (8.8)	19 (55.9)	12 (35.3)	3 (8.8)	11 (31.4)	18 (51.4)	6 (17.1)
<b>p (OR; 95% CI)</b>	0.8 (1.1;0.3-3.8)			0.818 (1.5;0.4-5.6)			<b>0.016 (4.2;1.4-12.5)</b>		
<b>HL</b>	9 (45.0)	9 (45.0)	2 (10.0)	9 (45.0)	9 (45.0)	2 (10.0)	7 (33.3)	11 (52.4)	3 (14.3)
<b>p (OR; 95% CI)</b>	0.861 (1.2;0.3-5.6)			0.835 (1.7;0.4-8.2)			0.181 (3.4; 0.9-13.5)		

NHL: Non-Hodgkin's lymphoma. HL: Hodgkin's lymphoma. FL: Follicular lymphoma. DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma. The p-value was calculated using the recessive model.

variant [37]. The role of this SNP in haematological malignancies has only been studied in two independent studies which found an association of rs662 with lymphohaematopoietic cancers [38] and lymphoma [9].

In our work, we studied the functional germline polymorphisms rs1051740, rs1800566 and rs662 in lymphoma patients and controls. Although the study subjects come from the same geographical area, important aspects concerning the source of cases and controls have to be taken into account. First, the controls do not represent exactly the general population since they are blood donors and second there is a degree of heterogeneity in the cases since they comprise several types of lymphoma that may be caused by different etiological factors. We found that rs1051740 or rs1800566 in EPHX1 and NQO1 were not related with lymphoma susceptibility as previously reported by others [8]. In contrast, we observed that rs662 in PON1 was associated with lymphoma risk, being the GG genotype related with increased susceptibility to lymphoma in general, and to FL and DLBCL in particular. This finding is concordant with that reported by Kerridge et al. analysing DNA extracted from archival tumour specimens from a population of 169 NHL cases and 205 controls [9]. The

rationale for performing the joint effect analysis of the studied SNPs is that, under a mixture of different pollutants, the contribution of polymorphisms in different metabolizing enzymes could exert an additive effect in disease susceptibility than can only be identified considering the SNPs as in combination. This analysis revealed that the combination of the PON1, EPHX1 and NQO1 polymorphisms did not increase the lymphoma risk associated with the PON1 polymorphism alone (OR = 1.7 vs. 1.5). The elegant study carried out by De Roos et al. in 1,172 cases and 982 controls found that another PON1 SNP (rs854560), but not rs662, was associated with a slightly increase of NHL [8]. Possible reason for this difference could be that the geographical characteristics pertaining to proximity to chemical industries were not the same or not considered. Taken together, our results could serve as a starting point for future studies in which both pollutant activity and the genotype influence could be studied. The identification of the type of compound or industry possibly implicated in this effect could be very interesting, but it is beyond the scope of this study. Recent genome-wide association studies (GWAS) have identified polymorphisms associated with lymphoma risk such as rs10484561 [39], rs2647012 [40]

**Table 4 Joint effect analysis of polymorphic loci for EPHX1 (rs1051740), NQO1 (rs1800566) and PON1 (rs662), respectively**

Joint alleles	Case (freq)	Control (freq)	Fisher's p	Pearson's p	OR; 95% CI
C C A	63.1 (0.16)	70.3 (0.16)	0.689	0.689	0.9; 0.6-1.3
C C G	22.3 (0.06)	21.8 (0.05)	0.836	0.836	0.9; 0.6-2.0
C T A	11.1 (0.03)	16.4 (0.04)	0.352	0.352	0.7; 0.3-1.5
T C A	136.2 (0.34)	166.3 (0.39)	0.078	0.078	0.8; 0.6-1.0
T C G	98.0 (0.24)	65.6 (0.15)	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>1.7; 1.2-2.5</b>
T T A	43.2 (0.11)	51.0 (0.12)	0.511	0.511	0.9; 0.6-1.3
T T G	27.6 (0.07)	26.1 (0.06)	0.722	0.722	1.1; 0.6-1.9

All those frequency < 0.03 will be ignored in analysis.

and rs6457327 [41] in the human leukocyte antigen (HLA) region on 6p21.32 and 6p21.33. Very recently, a novel region on 11q12.1 showed also association with lymphoma susceptibility [42]. Interestingly, none of these polymorphisms seems to lie on xenobiotic metabolizing genes. At this point, it is important to take into account that lymphomagenesis is a multifactorial process, and genetic-determined suboptimal xenobiotic metabolizing machinery could partly explain not all lymphoma cases but some of them, which have developed under certain exposure conditions. Geographical restriction of cases and controls is not a common feature of GWAS and, despite their undoubted utility in assessing the genetic determinants of the diseases, this approach could hamper the understanding of the contribution of xenobiotic exposure to lymphomagenesis.

## Conclusions

This is the first study demonstrating a relationship between the germline rs662 *PON1* polymorphism and lymphoma risk although this finding should be confirmed in larger and independent series.

## Abbreviations

DLBCL: Diffuse large B-cell lymphoma; EPHX1: Epoxide hydrolase 1; FL: Follicular lymphoma; HL: Hodgkin's lymphoma; HQ: Hydroquinone; NHL: Non-Hodgkin's lymphoma; LD: Linkage Disequilibrium; NQO1: NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; PCR: Polymerase chain reaction; PON1: Paraoxonase 1; SNP: Single nucleotide polymorphisms.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

PCZ: Conception and design of the study, DNA extraction and manuscript drafting; JRC and DTM: Genetic analysis and interpretation of data; IE, MDGM and EPC: Analysis and interpretation of clinical data, JTS: Statistical analysis; RGC: DNA extraction and data analysis, JC, W and MPG: Critical revision of the manuscript for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

We are very grateful to all personnel from the Madrid division of Spanish Genotyping National Center (Cegen) in the National Oncology Research Center (CNIO), Madrid, Spain for their contribution to the early stages of the study and to Diego Arcas for reviewing the English version of the manuscript. This work was funded by CajaMurcia Foundation (project reference:CM/12/08), Murcia, Spain.

## Author details

<sup>1</sup>Molecular Pathology and Pharmacogenetic Group. Pathology Department, Santa Lucía General University Hospital (HGUSL), 30202, Cartagena, Spain. <sup>2</sup>Haematology Department. (HGUSL), 30202, Cartagena, Spain. <sup>3</sup>Internal Medicine Department. (HGUSL), 30202, Cartagena, Spain. <sup>4</sup>Haematology Department, Morales Meseguer University Hospital (HGUMM), Murcia, Spain. <sup>5</sup>Department of Medicine, Centro Regional de Hemodonación, 30003, Murcia, Spain.

Received: 24 September 2012 Accepted: 1 May 2013  
Published: 7 May 2013

## References

1. Shimada T: Xenobiotic-Metabolizing Enzymes involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006, **21**:257–276.
2. Rose RL, Hodgson E: Adaptation to Toxicants. Chemical and Environmental Factors Affecting Metabolism of Xenobiotics. In *Introduction to biochemical toxicology*. Edited by Hodgson E, Smart RC. New York: Wiley; 2001:163–198.
3. Fritschi L, Benke G, Hughes AM, et al: Occupational Exposure to Pesticides and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Am J Epidemiol* 2005, **162**:849–857.
4. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, et al: Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. *Cancer Res* 2004, **64**:2264–2269.
5. Wong O, Fue H: Exposure to benzene and non-Hodgkin lymphoma, an epidemiologic overview and an ongoing case-control study in Shanghai. *Chem Biol Interact* 2005, **153**–154:33–41.
6. Fritschi L, Benke G, Hughes AM, et al: Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with occupational exposure to solvents, metals, organic dusts and PCBs (Australia). *Cancer Causes Control* 2005, **16**:599–607.
7. Lamm SH, Engel A, Byrd DM: Non-Hodgkin lymphoma and benzene exposure: a systematic literature review. *Chem Biol Interact* 2005, **153**–154:231–237.
8. De Roos AJ, Gold LS, Wang S, et al: Metabolic gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006, **15**:1647–1653.
9. Kerridge I, Lincz L, Scorgie F, Hickey D, Granter N, Spencer A: Association between xenobiotic gene polymorphisms and non-Hodgkin's lymphoma risk. *Br J Haematol* 2002, **118**:477–481.
10. Sarmanova J, Benesova K, Gut I, Nedelcheva-Kristensen V, Tynkova L, Soucek P: Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Molec Genet* 2001, **10**:1265–1273.
11. Barry KH, Zhang Y, Lan Q, et al: Genetic variation in metabolic genes, occupational solvent exposure, and risk of non-hodgkin lymphoma. *Am J Epidemiol* 2011, **173**:404–413.
12. Infante-Rivard C, Vermunt JK, Weinberg CR: Excess transmission of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T polymorphism in families of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Epidemiol* 2007, **165**:1248–1254.
13. Infante-Rivard C, Labuda D, Krajcinovic M, Sinnott D: Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphisms. *Epidemiology* 1999, **10**:481–487.
14. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al: *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008.
15. Ruiz-Cosano J, Conesa-Zamora P, González-Conejero R, et al: Role of GSTT1 and M1 null genotypes as risk factors for B-cell lymphoma: influence of geographical factors and occupational exposure. *Mol Carcinog* 2012, **51**:508–513.
16. García-Pérez J, Boldo E, Ramis R, et al: Description of industrial pollution in Spain. *BMC Public Health* 2007, **7**:40.
17. Cirera L, Rodríguez M, Giménez J, et al: Effects of public health interventions on industrial emissions and ambient air in Cartagena, Spain. *Environ Sci Pollut Res Int* 2009, **16**:152–161.
18. Real D: 1197/1979 de 20 de Febrero, por el que se declara aplicable a parte del término municipal de Cartagena (Murcia) las medidas y beneficios previstos en la Ley 38/1972 de Diciembre, y Reglamentación complementaria de protección del ambiente atmosférico. *Spanish Government Official Bulletin (BOE)* 1979, **123**:11406.
19. López-Abente G, Hernández-Barrera V, Pollán M, et al: Municipal pleural cancer mortality in Spain. *Occup Environ Med* 2005, **62**:195–199.
20. Lopez-Abente G, Aragones N, Ramis R, et al: Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: possible role of mining and industry. *BMC Public Health* 2006, **6**:17.
21. Gauderman WJ, Morrison JM: *QUANTO 1.1: A Computer program for power and sample size calculations for genetic-epidemiology studies*. 2006. <http://hydra.usc.edu/gxe>.
22. Li Z, Zhang Z, He Z, Tang W, Li T, Zeng Z, He L, Shi Y: A partition-ligation-combination-subdivision EM algorithm for haplotype inference with multiallelic markers: update of the SHEsis (<http://analysis.bio-x.cn>). *Cell Res* 2009, **19**:519–523.

23. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ: **Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants.** *Hum Molec Genet* 1994, **3**:421–428.
24. Tumer TB, Sahin G, Arinç E: **Association between polymorphisms of EPHX1 and XRCC1 genes and the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Arch Toxicol* 2012, **86**:431–439.
25. Silveira Vda S, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Tone LG: **Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children.** *Environ Mol Mutagen* 2010, **51**:48–56.
26. Chauhan PS, Ihsan R, Mishra AK, Yadav DS, Saluja S, Mittal V, et al: **High order interactions of xenobiotic metabolizing genes and P53 codon 72 polymorphisms in acute leukemia.** *Environ Mol Mutagen* 2012, **53**:619–630.
27. da Silva SV, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Bettiol H, Valera ET, et al: **Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Leuk Res* 2009, **33**:898–901.
28. Moran JL, Siegel D, Ross D: **A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity.** *Proc Nat Acad Sci* 1999, **96**:8150–8155.
29. Rothman N, Smith MT, Hayes RB, et al: **Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone.** *Cancer Res* 1997, **57**:2839–2842.
30. Chan JY, Ugrasena DG, Lum DW, Lu Y, Yeoh AE: **Xenobiotic and folate pathway gene polymorphisms and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia in Javanese children.** *Hematol Oncol* 2011, **29**:116–123.
31. Krajinovic M, Sinnott H, Richer C, Labuda D, Sinnott D: **Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia.** *Int J Cancer* 2002, **97**:230–236.
32. Stanulla M, Dynybil C, Bartels DB, Dördelmann M, Löning L, Claviez A, et al: **The NQO1 C609T polymorphism is associated with risk of secondary malignant neoplasms after treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia: a matched-pair analysis from the ALL-BFM study group.** *Haematologica* 2007, **92**:1581–1582.
33. Guha N, Chang JS, Chokkalingam AP, Wiemels JL, Smith MT, Buffler PA: **NQO1 polymorphisms and de novo childhood leukemia: a HuGE review and meta-analysis.** *Am J Epidemiol* 2008, **168**:1221–1232.
34. Eguchi-Ishimae M, Eguchi M, Ishii E, Knight D, Sadakane Y, Isoyama K, et al: **The association of a distinctive allele of NAD(P)H:quinone oxidoreductase with pediatric acute lymphoblastic leukemias with MLL fusion genes in Japan.** *Haematologica* 2005, **90**:1511–1515.
35. Sirma S, Agaoglu L, Yildiz I, Cayli D, Horgusluoglu E, Anak S, et al: **NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 null genotype is not associated with pediatric de novo acute leukemia.** *Pediatr Blood Cancer* 2004, **43**:568–570.
36. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN: **Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities.** *J Lipid Res* 2005, **46**:1239–1247.
37. Humbert R, Adler DA, Distèche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE: **The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism.** *Nature Genet* 1993, **3**:73–76.
38. Kokouva M, Koureas M, Dardiotis E, Almpantidou P, Kalogeraki A, Kyriakou D, et al: **Relationship between the paraoxonase 1 (PON1) M55L and Q192R polymorphisms and lymphohaematopoietic cancers in a Greek agricultural population.** *Toxicology* 2012. in press.
39. Conde L, Halperin E, Akers NK, Brown KM, Smedby KE, Rothman N, et al: **Genome-wide association study of follicular lymphoma identifies a risk locus at 6p21.32.** *Nat Genet* 2010, **42**:661–4.
40. Smedby KE, Foo JN, Skibola CF, Darabi H, Conde L, Hjalgrim H, et al: **GWAS of follicular lymphoma reveals allelic heterogeneity at 6p21.32 and suggests shared genetic susceptibility with diffuse large B-cell lymphoma.** *PLoS Genet* 2011, **7**:e1001378.
41. Skibola CF, Bracci PM, Halperin E, Conde L, Craig DW, Agana L, et al: **Genetic variants at 6p21.33 are associated with susceptibility to follicular lymphoma.** *Nat Genet* 2009, **41**:873–5.
42. Vijai J, Kirchoff T, Schrader KA, Brown J, Dutra-Clarke AV, Manschreck C, et al: **Susceptibility loci associated with specific and shared subtypes of lymphoid malignancies.** *PLoS Genet* 2013, **9**:e1003220.

doi:10.1186/1471-2407-13-228

**Cite this article as:** Conesa-Zamora et al.: Polymorphisms in xenobiotic metabolizing genes (EPHX1, NQO1 and PON1) in lymphoma susceptibility: a case control study. *BMC Cancer* 2013 **13**:228.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



ORIGINAL ARTICLE

## Influence of polymorphisms in ERCC5, XPA and MTR DNA repair and synthesis genes in B-cell lymphoma risk. A case-control study in Spanish population

J. Ruiz-Cosano, D. Torres-Moreno, P. Conesa-Zamora

Molecular Pathology and Pharmacogenetic Group. Pathology Department, Santa Lucía General University Hospital (HGUSL), Cartagena, Spain

### Summary

**Purpose:** Functions pertaining to DNA repair and synthesis are believed to play a critical role in cancer development and seem to be affected by genetic polymorphisms. Herein we performed a case-control study evaluating the influence of three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in XPA, ERCC5 and MTR [rs1800975 (G-4A), rs17655 (Asp1104His) and rs1805087 (A2756G), respectively] in lymphoma risk.

**Methods:** Genotype distributions were studied in 213 lymphoma Caucasian patients (193 non-Hodgkin/NHL and 20 Hodgkin lymphoma/HL) and 214 controls, residents in a re-

gion of Southeast Spain.

**Results:** No significant differences were observed in the genotype distributions between cases and controls for the studied SNPs. This lack of association was also observed when stratifying for gender or lymphoma type.

**Conclusion:** Our results suggest that the rs1800975, rs17655 and rs1805087 SNPs in DNA repair and synthesis of genes do not seem to play a major role in lymphoma susceptibility.

**Key words:** ERCC5, lymphoma, MTR, polymorphism, XPA, XPG

### Introduction

XPA (Xeroderma pigmentosum complementation group A; also known as XPI or XPAC) and ERCC5 (Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 5, also known as XPG or XPGC) are two enzymes part of the nucleotide excision repair (NER) pathway implicated in DNA repair machinery whose genes are located in 9q22.3 and 13q33, respectively. Qualitative and/or quantitative alterations in the activity of such enzymes can lead to abnormal accumulation of DNA mutations which eventually can trigger a carcinogenic process. MTR (5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase, also known as MS) whose gene is located in 1q43 is an enzyme involved in folate and methionine metabolism playing an essential role in both DNA synthesis and methylation processes.

Similarly, suboptimal function of such enzymes would also lead to higher rate of DNA mutations [1].

In fact, SNPs affecting ERCC5, XPA and MTR genes have been found to influence the susceptibility to the development of certain cancer types. Although, several studies have reported the association of certain allelic variants in XPA, ERCC5 and MTR such as rs1800975 (also known as G-4A), rs17655 (Asp1104His) and rs1805087 (A2756G) with increased risk of breast [2,3], lung [4,5], prostate [6] or head and neck [7] cancers, little information has been reported in lymphoma [8-10].

It has been demonstrated that exposure to UV and chemical industry compounds can cause DNA damage [11,12]. Under these circumstances the effect of SNPs in DNA repair genes or in genes involved in DNA synthesis may be of special relevance for the appearance of inter-individual dif-

ferences in cancer susceptibility. In this study we aimed at studying the influence of three SNPs in XPA, ERCC5 and MTR (rs1800975, rs17655 and rs1805087, respectively) in lymphoma by means of a case-control study.

**Methods**

*Study subjects*

Blood samples were obtained from 213 B-cell lymphoma (BCL) Caucasian patients -193 NHL and 20 HL- residents of either Murcia or Cartagena, in the Southeast of Spain. Our study subjects came largely from a previous described series of patients diagnosed between 2004 and 2010 at the HUSMR in Cartagena and Morales Meseguer University Hospital in Murcia [13]. Data on gender, age and place of residence were obtained from medical records. The control group comprised 214 unrelated Caucasian healthy blood donors matched for age, gender and geographical location without a previous history of malignancy. Informed consent was obtained from all subjects, the study was approved by the local Ethics Committee and was in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000.

*DNA extraction and genotyping*

Total genomic DNA was obtained from blood samples using the automatic DNA extraction system Maxwell 16 and DNA extraction kit for blood samples (cat: AS1010) (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer’s instructions. DNA was quantified by UV absorbance using the Biophotometer by Eppendorf (Hilden, Germany).

Polymorphisms were determined by allelic discrimination using TaqMan probes and a 7500F real-time PCR thermocycler both provided by Applied Biosystems (Foster City, CA).

*Statistics*

Statistical analysis was performed using the SPSS computer program Version 15.0 (Chicago, Illinois, USA). Student’s t-test was used to compare mean age of cases and controls and Yeats-corrected Pearson  $\chi^2$  test was used to evaluate statistical significance of genotype distribution in cases and controls using the dominant model for the p-value calculation which was considered taking into account the Bonferroni correction for multiple testing, thus taking  $p < 0.017$  as significant.

**Results**

Mean age did not differ between cases and controls (mean 53.7;  $\pm$ SD 15.1 vs. 53.9 $\pm$ 8.4;  $p=0.866$ ). Forty-nine percent (N=104) of cases were female whereas this percentage was 53.3% (N=114) in controls ( $p=0.358$ ). Genotyping was successfully performed on all study subjects. The genotype frequencies in the study population were XPA: GG 42.6%, GA 50.1%, AA 7.3%; ERCC5: GG 57.1%, GC 35.6%, CC 7.3% and MTR: AA 70.2%, AG 25.1%, GG 4.7%, similar to the HapMap-CEU (European) frequencies (XPA: GG 37.2%, GA 49.6%, AA 13.3%; ERCC5: GG 53.3%, GC 40.0%, CC 6.7% and MTR: AA 68.8%, AG 30.3%, GG 9.0%; [http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov]).

No significant differences were observed in the genotype distributions of rs1800975, rs17655 and rs1805087 polymorphisms between cases and controls (Table 1). This lack of association was

**Table 1.** XPA, ERCC5 and MTR genotype distributions in cases and controls and according to gender. P-value was calculated using the dominant model

		XPA (GG vs GG+GA)			ERCC5 (GG vs GC+CC)			MTR (AA vs AG+ GG)		
		GG N (%)	GA N (%)	AA N (%)	GG N (%)	GC N (%)	CC N (%)	AA N (%)	AG N (%)	GG N (%)
Total	Cases	90 (42.3)	102 (47.9)	21 (9.9)	125 (58.7)	71 (33.3)	17 (8.0)	148 (69.8)	52 (24.5)	12 (5.7)
	Controls	92 (43.0)	112 (52.3)	10 (4.7)	119 (55.6)	81 (37.9)	14 (6.5)	151 (70.6)	55 (25.7)	8 (3.7)
	<i>p</i> (OR; 95%CI)	0.878 (1.0; 0.7-1.4)			0.521 (1.1; 0.8-1.7)			0.866 (1.0; 0.6-1.5)		
Females	Cases	40 (38.5)	54 (51.9)	10 (9.6)	65 (63.1)	34 (33.0)	4 (3.9)	70 (68.6)	26 (25.5)	6 (5.9)
	Controls	47 (41.2)	61 (53.5)	6 (5.3)	65 (57.0)	40 (35.1)	9 (7.9)	83 (72.8)	27 (23.7)	4 (3.5)
	<i>p</i> (OR; 95%CI)	0.677 (0.9; 0.5-1.5)			0.361 (1.3; 0.7-2.2)			0.500 (0.8; 0.5-1.5)		
Males	Cases	50 (45.9)	48 (44.0)	11 (10.1)	60 (45.5)	37 (33.6)	13 (11.8)	78 (70.9)	26 (23.6)	6 (5.5)
	Controls	45 (45.0)	51 (51.0)	4 (4.0)	54 (54.0)	41 (41.0)	5 (5.0)	68 (68.0)	28 (28.0)	4 (4.0)
	<i>p</i> (OR; 95%CI)	0.512; (0.8; 0.5-1.5)			0.937 (1.0; 0.6-1.8)			0.647 (1.1; 0.6-2.1)		

CI:confidence interval, OR:odds ratio. For other abbreviations see text

also observed when stratifying for gender or lymphoma type (Table 2).

## Discussion

Potential carcinogenic exposure of either endogenous or exogenous nature can cause DNA damage which, in turn, can contribute to cancer development. Therefore, the efficiency of DNA repair and synthesis enzymatic machinery is critical for diminishing the carcinogenic effects. Polymorphisms in the genes coding these enzymes are believed to constitute a molecular basis for inter-individual differences in cancer susceptibility. Herein, we have studied the effect of rs1800975, rs17655 and rs1805087 polymorphisms in XPA, ERCC5 and MTR genes, respectively, in lymphoma risk. These polymorphisms have demonstrated a susceptibility role in different types of tumors [2,4,14], however their role in lymphoma is unknown or controversial. Overall, genetic polymorphisms in NER pathway seem to be associated with NHL [8] and several studies have found some associations between polymorphisms in XRCC1 DNA repair gene and lymphoma risk [8,15-17] whilst others did not find such a relationship [18-20].

XPA is responsible for repair of UV radiation-induced photoproducts and DNA adducts induced by chemical carcinogens. Wang et al. demonstrated that the rs1800975 XPA polymorphism was associated with differences in DNA

damage in coke oven workers [21]. Despite this fact, our results did not reveal any association of this polymorphism with lymphoma, in concordance with the results reported by El-Zein et al. for HL [19].

ERCC5 is a single-strand specific DNA endonuclease that makes the 3' incision in DNA excision repair following UV-induced damage. El-Zein et al. in HL [19] and Shen in NHL [8] did not find any relationship between ERCC5 rs17655 and lymphoma risk, although the latter group found an association with NHL in American women [20]. Accordingly to the former studies we did not observe any relationship between this polymorphism and lymphoma susceptibility in our study population, either in males or females.

MTR catalyzes the final step in methionine biosynthesis and is involved in both DNA synthesis and methylation. Although a meta-analysis demonstrated an effect of MTR rs180587 on NHL development [22] these authors and others did not find such an association in the study population of NHLs [22-24] or lymphomas [9]. In accordance with these studies, we did not identify any relationship between this SNP and lymphoma susceptibility in our study. In contrast, the study by Lincz et al. showed a protective role of AG/GG genotypes in NHL risk [10]. However, in this work cancer tissue specimens were used for SNP genotyping which is not recommended for genetic susceptibility studies because possible allelic somatic losses produced during the carcinogenic

**Table 2.** XPA, ERCC5 and MTR genotype distributions according to the lymphoma diagnosis. P-value was calculated using the dominant level

	XPA			ERCC5			MTR		
	GG N(%)	GA N(%)	AA N(%)	GG N(%)	GC N(%)	CC N(%)	AA N(%)	AG N(%)	GG N(%)
Controls	92 (43.0)	112 (52.3)	10 (4.7)	119 (55.6)	81 (37.9)	14 (6.5)	151 (70.6)	55 (25.7)	8 (3.7)
NHL	86 (44.6)	91 (47.2)	16 (8.3)	118 (61.1)	62 (32.1)	13 (6.7)	135 (70.3)	48 (25.0)	9 (4.7)
<i>p</i> (OR; 95%CI)	0.750 (1.1; 0.7-1.6)			0.228 (1.3; 0.9-2.0)			0.956 (1.0; 0.6-1.5)		
FL	56 (49.6)	56 (41.5)	12 (8.9)	81 (60.0)	46 (34.1)	8 (5.9)	90 (67.2)	36 (26.9)	8 (6.0)
<i>p</i> (OR; 95%CI)	0.698 (1.1; 0.7-1.7)			0.884 (1.0; 0.7-1.6)			0.504 (0.9; 0.5-1.4)		
DLBCL	11 (32.4)	20 (58.8)	3 (8.8)	21 (61.8)	8 (23.5)	5 (14.7)	28 (82.4)	6 (17.6)	0 (0)
<i>p</i> (OR; 95%CI)	0.242 (0.6; 0.3-1.4)			0.778 (1.1; 0.5-2.3)			0.154 (1.9; 0.8-4.9)		
HL	4 (20.0)	11 (55.0)	5 (25.0)	7 (35.0)	9 (45.0)	4 (20.0)	13 (65.0)	4 (20.0)	4 (15.0)
<i>p</i> (OR; 95%CI)	0.046 (0.3; 0.1-1.0)			0.037 (0.4; 0.1-1.0)			0.410 (0.7; 0.3-1.7)		

NHL: non-Hodgkin's lymphoma, HL: Hodgkin's lymphoma, FL: follicular lymphoma, DLBCL: diffuse large B-cell lymphoma, CI: confidence interval, OR: odds ratio. For other abbreviations see text

process may mask the germline genotype. Interestingly, Niclot et al. after studying the rs180587 genotype distribution in 172 follicular lymphoma (FL) cases and 206 controls found that individuals carrying the AA genotype had 2-fold higher risk of FL [25]. We did not observe this relationship either in our 134 FL cases.

The effect of polymorphisms in DNA repair and synthesis genes in cancer risk is dependent on the particular carcinogenic process, thus it is subjected to particular environmental factors and other genetic determinants. This may be the reason for the inconsistency observed in these studies. In any case, our results suggest that the rs1800975,

rs17655 and rs1805087 polymorphisms in XPA, ERCC5 and MTR genes do not seem to play a major role in lymphoma susceptibility.

### Acknowledgements

This work was funded by Fundación CajaMurcia (project reference:CM/12/08), Murcia, Spain. We are grateful to the personnel from the Spanish Genotyping National Center (Cegen), Madrid, Spain, for their contribution to the early stages of the study and to Diego Arcas for reviewing the English version of the manuscript.

### References

- Zingg JM, Jones PA. Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18: 869-882.
- Han W, Kim KY, Yang SJ, Noh DY, Kang D, Kwack K. SNP-SNP interactions between DNA repair genes were associated with breast cancer risk in a Korean population. *Cancer* 2012; 118: 594-602.
- de Cássia Carvalho Barbosa R, da Costa DM, Cordeiro DE, Vieira AP, Rabenhorst SH. Interaction of MTHFR C677T and A1298C, and MTR A2756G gene polymorphisms in breast cancer risk in a population in North-east Brazil. *Anticancer Res* 2012; 32: 4805-4811.
- Qian B, Zhang H, Zhang L, Zhou X, Yu H, Chen K. Association of genetic polymorphisms in DNA repair pathway genes with non-small cell lung cancer risk. *Lung Cancer* 2011; 73: 138-146.
- Jeon HS, Kim KM, Park SH et al. Relationship between XPG codon 1104 polymorphism and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1677-1681.
- Berhane N, Sobti RC, Mahdi SA. DNA repair genes polymorphism (XPG and XRCC1) and association of prostate cancer in a north Indian population. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 2471-2479.
- Galbiatti AL, da Silva LM, Ruiz-Cintra MT et al. Association between 11 genetic polymorphisms in folate-metabolising genes and head and neck cancer risk. *Eur J Cancer* 2012; 48: 1525-1531.
- Shen M, Purdue MP, Krickler A et al. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma in New South Wales, Australia. *Haematologica* 2007; 92: 1180-1185.
- Matsuo K, Hamajima N, Suzuki R et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphisms and reduced risk of malignant lymphoma. *Am J Hematol* 2004; 77: 351-357.
- Lincz LF, Scorgie FE, Kerridge I, Potts R, Spencer A, Enno A. Methionine synthase genetic polymorphism MS A2756G alters susceptibility to follicular but not diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003; 120: 1051-1054.
- Skipper PL, Kim MY, Sun HL, Wogan GN, Tannenbaum SR. Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: old is new again. *Carcinogenesis* 2010; 31: 50-58.
- Stone MP, Huang H, Brown KL, Shanmugam G. Chemistry and structural biology of DNA damage and biological consequences. *Chem Biodivers* 2011; 8: 1571-1615.
- Ruiz-Cosano J, Conesa-Zamora P, González-Conejero R et al. Role of GSTT1 and M1 null genotypes as risk factors for B-cell lymphoma: influence of geographical factors and occupational exposure. *Mol Carcinog* 2012; 51: 508-513.
- Cho S, Kim MJ, Choi YY et al. Associations between polymorphisms in DNA repair genes and TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2011; 73: 25-31.
- Kim IS, Kim DC, Kim HG et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and haplotypes in diffuse large B-cell lymphoma in a Korean population. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 196: 31-37.
- Liu J, Song B, Wang Z et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and non-Hodgkin lymphoma risk in a Chinese population. *Cancer Genet Cytogenet* 2009; 191: 67-72.
- Worrillow L, Roman E, Adamson PJ, Kane E, Allan JM, Lightfoot TJ. Polymorphisms in the nucleotide excision repair gene ERCC2/XPD and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol* 2009; 33: 257-260.
- Matsuo K, Hamajima N, Suzuki R et al. Lack of association between DNA base excision repair gene XRCC1 Gln399Arg polymorphism and risk of malignant lymphoma in Japan. *Cancer Genet Cytogenet* 2004; 149:

- 77-80.
19. El-Zein R, Monroy CM, Etzel CJ et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes as modulators of Hodgkin disease risk. *Cancer* 2009; 115: 1651-1659.
  20. Shen M, Zheng T, Lan Q et al. Polymorphisms in DNA repair genes and risk of non-Hodgkin lymphoma among women in Connecticut. *Hum Genet* 2006; 119: 659-668.
  21. Wang F, He Y, Guo H et al. Genetic variants of nucleotide excision repair genes are associated with DNA damage in coke oven workers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 211-218.
  22. Weiner AS, Beresina OV, Voronina EN et al. Polymorphisms in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res* 2011; 35: 508-515.
  23. Lee KM, Lan Q, Krickler A et al. One-carbon metabolism gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin lymphoma in Australia. *Hum Genet* 2007; 122: 525-533.
  24. Lightfoot TJ, Skibola CF, Willett EV et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2999-3003.
  25. Niclot S, Pruvot Q, Besson C et al. Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. *Blood* 2006; 108: 278-285.