



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

**BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y RIESGO
PARA CONTAMINANTES AMBIENTALES**

Tesis para optar al título profesional de Ingeniero en
Biotecnología Molecular

VÍCTOR DANIEL MARTÍNEZ ZAMORA

Director de Tesis: Dr. Lionel Gil Hormazábal



Santiago-Chile
2002

**BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y RIESGO
PARA CONTAMINANTES AMBIENTALES**

VÍCTOR DANIEL MARTÍNEZ ZAMORA

Director de Tesis:

Dr. Lionel Gil Hormazábal

Profesor Patrocinante

Dra. Margarita Carú Marambio



FACULTAD DE CIENCIAS UNIVERSIDAD DE CHILE

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE PREGRADO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Pregrado presentada por el candidato:

VICTOR MARTINEZ ZAMORA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 04 de Noviembre de 2002.

Director de Tesis
Dr. Lionel Gil Hormazábal

LA COMISION

Dra. Margarita Carú Marambio
Presidente

Dra. Marta Adonis Parraguéz

Dra. Patricia Pérez Alzola

INDICE DE MATERIAS

INDICE	i
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCION	1
- Características generales de la ciudad de Santiago	2
- Efectos de la contaminación ambiental sobre la salud humana	4
- Características generales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	8
- Metabolismo de los HAPs	
Reacciones de fase I	11
Reacciones de fase II	13
Reacciones de fase III	13
- Citocromo P-450	14

- Isoformas de citocromo p-450: activación de xenobióticos y relacion con cáncer pulmonar	
CYP1A1_____	23
CYP1B1_____	26
CYP3A4_____	27
- Glutación S-Transferasa clase Mu, tipo 1 (GSTM1)_____	28
- 1-Hidroxipireno como biomarcador de dosis efectiva de HAPs_____	31
- Incidencia del arsénico en cáncer pulmonar en la II región de Chile_____	35
- Estadísticas de cáncer en la II región_____	36
- Arsénico: Mecanismos de acción_____	38
- Biotransformación de arsénico_____	41
- Contaminación ambiental en la II región_____	44
- Detección del antígeno DR-70 como biomarcador de cancer pulmonar_____	46
 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS_____	 49
 METODOLOGIA_____	 52
- Grupos de estudio_____	53
- Materiales y métodos utilizados	
Extracción de ADN_____	55
Análisis por PCR_____	56
Análisis estadísticos_____	60
Análisis de las concentraciones de 1-OHP_____	61
Determinación de la actividad CYP3A4_____	63
Ensayo de inmunocuantificación del antígeno DR-70_____	64

RESULTADOS	66
- Polimorfismos genéticos en CYP1A1 (Msp1) y Glutación transferasa M1 (GSTM1) en individuos expuestos a emisiones diesel y voluntarios no expuestos	67
- Niveles de 1-hidroxicipireno urinario como indicador de exposición laboral a hidrocarburos aromáticos policíclicos	69
- Influencia de la actividad CYP3A4 sobre los niveles de 1-OHP urinario	72
- Influencia actividad CYP3A4 y polimorfismos Msp1 y GSTM1 en los niveles de 1-OH-pireno urinario	77
- Polimorfismos genéticos Msp1 y GSTM1 en pacientes con cáncer pulmonar e individuos sanos de la II región	80
- Polimorfismo Msp1 en la II Región	81
- Deleción en el gen de la glutatión-S-transferasa M1 (GSTM1)	86
- Análisis de riesgo combinado m2/GSTM1 "nulo"	89
- Niveles del antígeno DR-70 en individuos sanos y con cáncer pulmonar de Antofagasta	90
DISCUSION	93
CONCLUSIONES	126
REFERENCIAS	131
ANEXOS	146

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Índice de Calidad del Aire por Material Particulado_____	7
Tabla 2: Distintos tipos de citocromos P450s humanos involucrados en el metabolismo de xenobióticos_____	16
Tabla 3: Concentración de arsénico ($\mu\text{g/litro}$) en agua potable para las principales ciudades y pueblos de la segunda región, desde 1950 a 1994, con intervalos de 5 años, y promedios de población según el censo de 1991_____	37
Tabla 4: Distribución genotípica del polimorfismo Msp1 en el gen CYP1A1 en voluntarios expuestos y no expuestos a emisiones diesel_____	68
Tabla 5: Frecuencia de la delección en el gen GSTM1 en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel_____	69
Tabla 6: Niveles promedio de 6- β hidroxycortisol/ml en orina de Individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel_____	72
Tabla 7: Influencia de la actividad de CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel_____	74
Tabla 8: Influencia de la actividad CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario de individuos estratificados por exposición y hábito de fumar_____	75
Tabla 9: Influencia de la actividad CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario al estratificar por sexo y por exposición a emisiones intradomiciliarias_____	76
Tabla 10: Relación entre polimorfismos Msp1 y GSTM1 en niveles urinarios de 1-OHP en sujetos expuestos a emisiones diesel_____	77

Tabla 11: Influencia de CYP3A4 sobre los niveles de 1-OHP según la condición genética para Msp1_____	79
Tabla 12: Características generales de los grupos estudiados_____	81
Tabla 13: Frecuencia del polimorfismo Msp1 en controles sanos y en pacientes con cáncer pulmonar de Antofagasta_____	82
Tabla 14: Frecuencia para el polimorfismo Msp1 en controles sanos y pacientes fumadores con cáncer de la II Región_____	83
Tabla 15: Frecuencia del polimorfismo Msp1 en pacientes con cáncer pulmonar y controles no fumadores de Antofagasta_____	84
Tabla 16: Distribución genotípica del polimorfismo Msp1 en hombres sanos y casos con cáncer pulmonar de Antofagasta_____	85
Tabla 17: Distribución genotípica del polimorfismo Msp1 en mujeres sanas y casos con cáncer pulmonar de Antofagasta_____	85
Tabla 18: Frecuencia del polimorfismo GSTM1 en controles sanos y en pacientes con cáncer pulmonar de Antofagasta_____	86
Tabla 19: Frecuencia del polimorfismo GSTM1 en pacientes con cáncer pulmonar y controles sanos fumadores de Antofagasta_____	87
Tabla 20: Frecuencia del polimorfismo GSTM1 en controles y pacientes con cáncer pulmonar no fumadores de Antofagasta_____	87
Tabla 21: Frecuencia de la delección GSTM1 en hombres controles y con cáncer pulmonar de Antofagasta_____	88
Tabla 22: Frecuencia de la delección GSTM1 en mujeres controles y con cáncer pulmonar de Antofagasta_____	89
Tabla 23: Análisis de riesgo combinado m2/GSTM1 "nulo" para pacientes con cáncer pulmonar e individuos sanos de Antofagasta_____	90

Tabla 24: Niveles del Antígeno DR-70 en individuos controles, con
cáncer pulmonar (con y sin tratamiento) y con otras patologías
respiratorias de Antofagasta _____

92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Episodios de riesgo ambiental constatados entre 1997-2000 _____	6
Figura 2: Estructuras químicas y nombres de HAPs clasificados por la IARC en los grupos 2A y 2B _____	10
Figura 3: Esquema de biotransformación de xenobióticos _____	14
Figura 4: Estructura del Grupo Prostético de Citocromo P450 _____	17
Figura 5: Ciclo catalítico de P-450 _____	18
Figura 6: Activación del Benzo[a]pireno por P-450 _____	20
Figura 7: Inducción de P-450 _____	22
Figura 8: Estructura del gen CYP1A1 _____	23
Figura 9: Activación transcripcional mediada por receptor. Unión a regiones reguladoras _____	25
Figura 10: Metabolismo del pireno en humanos _____	34
Figura 11: Biotransformación del arsénico _____	43
Figura 12: Control de amplificación para Msp1 y GSTM1 _____	58
Figura 13: Análisis de digestión Msp1 _____	60
Figura 14: Reacción para la detección del antígeno DR-70 _____	65
Figura 16: Niveles promedio de 1-hidroxipireno urinario en trabajadores expuestos a emisiones diesel y en voluntarios no expuestos _____	70
Figura 17: Niveles de 1-OHP urinario en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel, estratificados por hábito de fumar _____	71

Figura 18: Correlación entre niveles de 1-OHP urinario y actividad CYP3A4 en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel _____	73
Figura 19: Niveles promedio de 1-OHP en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel estratificados por genotipo Msp1 _____	78
Figura 20: Niveles del antígeno tumoral DR-70 en pacientes con cáncer pulmonar y controles de Antofagasta _____	91
Figura 21: Frecuencia de m2 en diferentes poblaciones del mundo _____	98
Figura 22: Concentraciones de 1-OHP urinario en diferentes estudios _____	104

ABREVIATURAS

- **HAPs** : Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
- **CYP1A1**: Citocromo P-450 familia 1, subfamilia A, isoforma 1
- **GSTM1** : Glutación S-transferasa clase M1
- **CYP3A4**: Citocromo P-450 familia 3, subfamilia A, isoforma 4
- **1-OHP** : 1-hidroxipireno
- **MP** : material particulado
- **NATs** : N-acetiltransferasas
- **EH** : Epóxido hidrolasa
- **GSH** : Glutación reducido
- **BaP** : Benzo[a]pireno
- **Hsp** : Heat Shock Protein
- **ARNT** : Ah receptor nuclear translocator
- **XRE** : Xenobiotic-responsive element
- **iAs** : arsénico inorgánico
- **MMA** : monometilarsenato (ácido monometilarsónico)
- **DMA** : dimetilarsenato (ácido dimetilarsínico)
- **MRP** : multidrug resistance protein
- **COVs** : Compuestos orgánicos volátiles
- **I.C.** : intervalos de confianza
- **O.R.** : Odds Ratio
- **HFC** : High frequency cells
- **EPA** : Environmental Protection Agency, USA
- **PKC** : Proteína quinasa C
- **EGF** : Epidermal growth factor

RESUMEN

Antofagasta presenta una tasa de cáncer pulmonar 3 veces mayor que el resto del país, hecho que se relacionaría con las elevadas concentraciones de arsénico en el agua potable y posiblemente con la exposición a otros agentes cancerígenos. Por otro lado, estudios indican que en Santiago los motores diesel son la principal fuente de compuestos con potencial carcinogénico, como los HAPs (hidrocarburos aromáticos policíclicos).

El objetivo de este estudio fue determinar, en Antofagasta y Santiago, la frecuencia de polimorfismos en enzimas de biotransformación de Fase I y II (CYP1A1 y GSTM1), implicadas en el metabolismo de HAPs. Estos biomarcadores fueron correlacionados con la actividad CYP3A4 y con niveles de 1-hidroxipireno (1-OHP) urinario, utilizado como biomarcador de exposición a HAPs. Para las investigaciones sobre exposición a emisiones diesel, el grupo expuesto correspondió a personas sanas expuestas a estas emisiones en Santiago (N=87) y a un grupo control, conformado por individuos sanos de la localidad de Curacaví (N=47).

En Antofagasta, se compararon 103 personas sanas con 57 diagnosticadas con cáncer pulmonar. La sola presencia de m2 estuvo fuertemente asociada a riesgo de cáncer pulmonar en la población total (O.R.= 2.08, I.C.= 1.04-4.03, p-value: 0.04) y, al estratificar por sexo, en el caso de los hombres (O.R.= 2.60, I.C.= 1.07 - 5.94, p-value: 0.0334). La presencia del alelo mutado m2 combinada con la delección del gen GSTM1 incrementó el riesgo para cáncer pulmonar (O.R.=2.51, I.C.=1.07-5.40, p-value=0.0322)

Expuestos a emisiones diesel mostraron concentraciones mayores de 1-OHP que las personas de Curacaví (3.02 vs. 1.96 $\mu\text{mol/mol}$ creatinina, respectivamente), correlacionando significativamente con la actividad CYP3A4 y con la condición heterocigota para Msp1 (m1m2). Los individuos fumadores también mostraron concentraciones significativamente más altas de 1-OHP que los no fumadores (3.66 vs. 1.94 $\mu\text{mol/mol}$ creatinina).

También se analizó el antígeno DR-70 como biomarcador de cáncer pulmonar en la población de Antofagasta (85 casos de cáncer pulmonar y 88 controles). Los niveles de este antígeno resultaron ser significativamente mayores en pacientes con cáncer pulmonar sin tratamiento que en controles ($p<0.05$). Pacientes con cáncer pulmonar sometidos a tratamiento (cirugía, quimioterapia y radioterapia), mostraron niveles de antígeno significativamente menores que pacientes sin tratamiento.

En conclusión, los polimorfismos Msp1 y GSTM1 podrían utilizarse como biomarcadores de riesgo para cáncer pulmonar. Además la actividad CYP3A4 y la concentración urinaria de 1-OHP podrían ser buenos biomarcadores de exposición reciente a HAPs, especialmente en individuos portadores del alelo polimórfico m2.

El análisis de DR-70 demostró ser una valiosa herramienta tanto para el diagnóstico prematuro de cáncer pulmonar como para un seguimiento de la efectividad del tratamiento en la población chilena.

ABSTRACT

Antofagasta shows a rate of lung cancer 3 times greater than the rest of the country, fact that would be related to the high arsenic concentrations in drinking water and to exposition to other carcinogenic agents. On the other hand, studies indicates that in Santiago, diesel engines are the main source of compounds with carcinogenical potential, like the PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons).

The objective of this study was to determine, in the Second Region and Santiago, the frequency of polymorphisms in phase I and II biotransformation enzymes (CYP1A1 and GSTM1), implied in the metabolism of PAHs. These biomarkers were correlated with CYP3A4 activity and levels of urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP), used as exposition biomarker to PAHs. For the studies of exposition to diesel emissions, the exposed group corresponded to healthy people exposed to these emissions in Santiago (N=87) and to a control group conformed by healthy individuals of Curacaví (N=103).

In Antofagasta, 103 healthy people were compared with 57 diagnosed with lung cancer. The single presence of m2 was strongly associated to risk of lung cancer in the total population (O.R. = 2.08, I.C. = 1.04-4.03, p-value: 0.04) and, when stratifying for sex, in the case of the men (O.R. = 2.60, I.C. = 1.07 - 5.94, p-value: 0.0334). The presence of the mutated allele m2, combined with the GSTM1 deletion increased the risk for lung cancer (O.R. =2.51, I.C. =1.07-5.40, p-value=0.0322).

People exposed to diesel emissions showed greater concentrations of 1-OHP than people of Curacaví (3,02 versus 1,96 mol 1-OHP/mol creatinine, respectively), significantly correlating with CYP3A4 activity and the heterocygote condition for Msp1 (m1m2). The smokers also shows concentrations of 1-OHP significantly higher than nonsmokers (3,66 versus 1,94 mol/mol creatinine).

The antigen DR-70 was also analyzed as lung cancer biomarker in the population of Antofagasta (85 cases of lung cancer and 88 controls). The levels of this antigen turned out to be significantly bigger in patient with lung cancer without treatment that in controls ($p < 0.05$). Patient subjected to lung cancer treatments (surgery, chemotherapy and radiotherapy), showed significantly smaller levels of antigen that patient without treatment.

In conclusion, the presence of the polymorphisms Msp1 and GSTM1 could be used as risk biomarkers for lung cancer. In addition CYP3A4 activity and urinary concentration of 1-OHP could be good biomarkers of recent exposition to PAHs, specially in individuals carrying m2 polymorphic allele.

The DR-70 analysis demonstrated to be a valuable tool for the premature diagnosis of lung cancer and also, for following the effectiveness of the treatment in the Chilean population.

INTRODUCCIÓN

CARACTERISTICAS GENERALES DE LA CIUDAD DE SANTIAGO

La ciudad de Santiago, capital de Chile, con 4.8 millones de habitantes (casi el 38% del total nacional), aparece como la urbe con mayor contaminación atmosférica en el país y está dentro de las capitales más contaminadas de América (Gil y cols., 1993). La ciudad está ubicada en un valle a 600 m sobre el nivel del mar y posee un área urbanizada e industrial de 60.000 hectáreas. Entre los factores más comúnmente relacionados con el problema de contaminación, se pueden mencionar:

- (a) Situación geográfica: La ciudad está rodeada de montañas. Esta condición genera una pobre ventilación (sobretudo en épocas invernales), lo que impide la dispersión natural de los contaminantes ambientales.

- (b) Características climáticas: Debido al predominio de un anticiclón subtropical, Santiago posee un clima mediterráneo, caracterizado por escasos vientos, precipitaciones no superiores a 300 milímetros anuales y vegetación tipo arbusto. Estos factores favorecen la generación y el mantenimiento del polvo en suspensión en la atmósfera.

- (c) La presencia de una capa de inversión térmica que, generalmente, se ubica 900 m por sobre la superficie, pero puede llegar a estar sólo a 150 metros de altura.

- (d) Gran densidad poblacional, con una tasa de aumento de 1.97% anual (Fuente: INE, 2000).

- (e) Altos niveles de emisión, tanto de fuentes fijas como móviles. Existen alrededor de 6.573 fuentes fijas y, según el Ministerio de Transporte, hay casi unas 52.000 fuentes móviles que utilizan motores diesel, dentro de las que se incluyen 8.500 buses (4.500 de ellos no licitados) y 40.000 camiones. Además se estima que hay alrededor de 900.000 vehículos particulares (Fuente: CONAMA 2001).

- (f) Expansión horizontal de la ciudad, lo que implica un mayor número de viajes (y de más duración) para desplazarse de un punto a otro.

- (g) Gran número de industrias, que hasta hace poco estaban casi en su totalidad dentro del radio urbano de la ciudad (Gil y Adonis 1996).

Todos estos factores contribuyen, en distinta medida, a mantener una alta concentración de contaminantes ambientales en el aire de la capital, lo que

se refleja en elevadas tasas de enfermedades respiratorias crónicas en la población de Santiago.

Diversos elementos contaminantes provenientes de distintas fuentes han sido descritos en el aire de Santiago, con diferentes grados de toxicidad. Entre estos se pueden mencionar: gases (CO, SO₂, NO₂), metales pesados, compuestos orgánicos volátiles y material particulado (Gil y cols., 1991; Olaeta, 1991).

EFFECTOS DE LA CONTAMINACION AMBIENTAL EN LA SALUD HUMANA

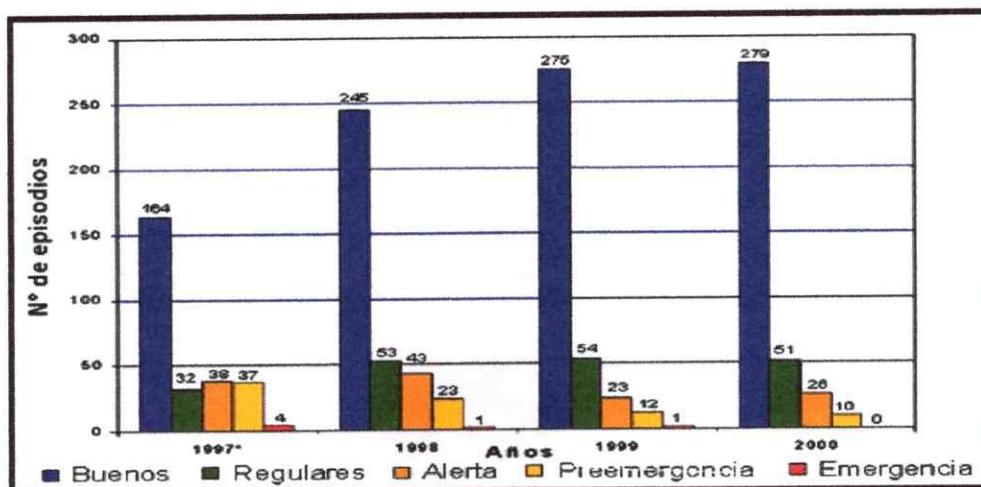
La contaminación atmosférica por material particulado (MP) es uno de los problemas de salud pública más graves que enfrenta la ciudad de Santiago. La concentración atmosférica de MP supera varias veces en el año (principalmente en la época invernal) la norma de 24 horas (150µg/m³ de aire), establecida para proteger la salud humana. Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte que el material particulado puede tener una alta incidencia en muertes por enfermedades respiratorias crónicas, especialmente en los grupos de mayor riesgo: niños, ancianos y mujeres embarazadas (WHO, 1987).

El MP puede clasificarse en tres categorías: Partículas totales en suspensión (PTS), MP_{10} , que corresponde a partículas cuyo diámetro aerodinámico es inferior a 10 micrones y $MP_{2.5}$, constituido por partículas de un diámetro que no supera los 2.5 micrones.

Aún cuando la Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) ha declarado que el n° de episodios críticos ambientales, entre los años 1997 y 2000, han disminuido considerablemente, la norma chilena para MP_{10} fue superada durante 87 días en el año 2000 (figura 1). La OMS recomienda que para disminuir los efectos en la salud, esta norma no debería ser sobrepasada por más de **1 día durante todo el año**. Un estudio realizado en Santiago de Chile por Ostro y colaboradores (1996) describió una asociación significativa entre MP_{10} (obtenido en Santiago) y mortalidad por causas cardiovasculares o respiratorias. Este estudio mostró que un incremento de $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ en las concentraciones diarias de MP_{10} , provoca un aumento de un 1% en la mortalidad.

Se ha descrito además que las partículas de tamaño inferior a $10\mu\text{m}$ de diámetro se depositan en la región traqueo-bronquial, produciendo asma, bronquitis, efisema y existe una alta probabilidad de que también puedan causar cáncer pulmonar (Möller, 1994; Gamble y Lewis, 1996; Peters y cols., 1997; Nakanishi y cols., 1997; Ostro y Chestnut, 1998; Gamble, 1998).

Figura 1: Episodios de riesgo ambiental constatados entre 1997-2000



La tabla 1 muestra la equivalencia entre los índices de calidad del aire referidos a partículas (ICAP), utilizado para traducir la información a escalas menos complejas y más comprensibles para la población; y los valores reales de concentración de MP_{10} en la atmósfera. Se puede observar que el nivel "regular" (ICAP 100), corresponde a la norma permitida para Chile. El episodio de **ALERTA** (ICAP 200), descrito como el nivel en que se perciben efectos notorios en las personas más susceptibles (niños prematuros, ancianos y enfermos crónicos), se declara recién al superar los $195 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente, 2002).

Tabla 1: Índice de Calidad del Aire por Material Particulado

ICAP	Categoría ICAP	MP ₁₀ µg/m ³ (24 hrs.)	Nivel	Episodio
0-100 Bueno	0	0	0	-
101-200 Regular	100	150 (norma chilena)	0	-
201-300 Malo	200	195	1	Alerta
301-400 Crítico	300	240	2	Preemergencia
401-500 Peligroso	400	285	2	Preemergencia
>501 Excede	500	330	3	Emergencia

El material particulado proveniente de las emisiones diesel ha sido descrito como extremadamente peligroso para la salud humana, principalmente por los cientos de compuestos altamente tóxicos adsorbidos en él (Rosenkranz, 1996; Adonis y Gil, 2000). Su reducido tamaño le permite ingresar fácilmente en las vías respiratorias. Incluso, en el caso del MP_{2.5}, pueden alcanzar directamente los alvéolos pulmonares, saltándose la barrera ciliar protectora y transportando sustancias potencialmente cancerígenas a distintos órganos. En estas partículas se adsorben cientos de compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y nitroarenos, entre otros, los cuales presentan un alto grado de carcinogenicidad. La IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha clasificado a las emisiones diesel en el

grupo 2A, o sea, probablemente cancerígenas para humanos (con alto grado de evidencia. IARC, 2002).

Entre las mayores fuentes de contaminación de la ciudad de Santiago, se pueden mencionar: procesos industriales, generación de energía (centrales termoeléctricas, algunas ubicadas en sectores densamente poblados), emisiones vehiculares, etc. Desde el punto de vista de la toxicidad de material particulado, se podrían mencionar, entre las emisiones más peligrosas, las generadas por vehículos, especialmente los de transporte público y de carga que funcionan con motores diesel. Muchos de estos vehículos trabajan con combustibles de mala calidad (a pesar de que esta situación está variando), con tecnologías obsoletas y tienen una pobre mantención, lo que agrava más aún el problema.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS HIDROCARBUROS

AROMÁTICOS POLICICLICOS

Los HAPs son compuestos químicos con número variable de anillos aromáticos, generados por pirólisis incompleta de materia orgánica y que se liberan al ambiente como una compleja mezcla de elementos. La mayoría de estos compuestos son no volátiles. Los HAP con menos de tres anillos (peso

molecular: 128-178) están presentes en la fase gaseosa de las emisiones diesel; los de 4 anillos (PM=208) están presentes tanto en la fase gaseosa como en el material particulado, mientras que los de PM >208 están adsorbidas en el material particulado. El coeficiente de partición octanol/agua varía entre 3.5 y 6.6 (Jongeneelen, 2001)

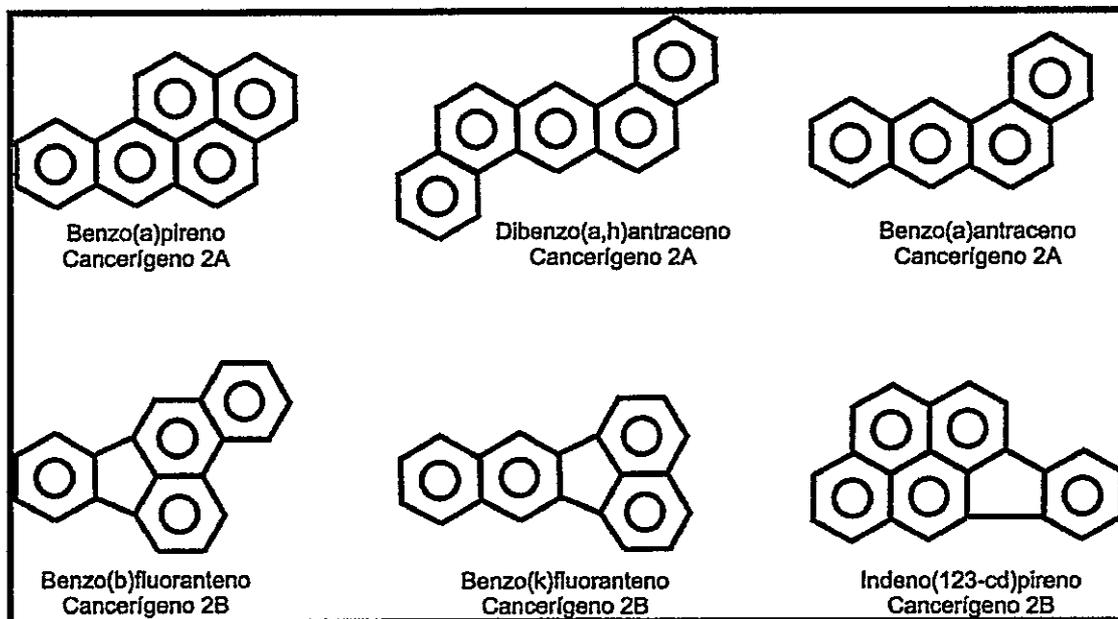
Las principales fuentes de emisión de los HAPs son los motores (diesel y gasolina), humo de cigarrillo, calefacción (gas, kerosene, leña, carbón, etc.), actividades industriales, alimentos ahumados o asados en exceso, etc. Estos compuestos son químicamente inertes cuando se encuentran en su estado natural en la atmósfera, pero su alta hidrofobicidad les permite atravesar la membrana celular y penetrar fácilmente a la célula, donde son metabolizados por diferentes enzimas de biotransformación, convirtiéndose en potentes agentes mutagénicos y/o cancerígenos (Gibson y Skeet, 1986).

Muchos metabolitos de HAPs y nitro-HAP presentan actividad carcinogénica en animales de experimentación y por consiguiente tienen una alta probabilidad de causar efectos similares en humanos. La IARC ha clasificado al **benzo[a]antraceno, dibenzo[a]antraceno y benzo[a]pireno** en el grupo 2A (probablemente cancerígenos en humanos). Las estructuras moleculares de estos compuestos se muestran en la figura 2.

Además, en el grupo 2B, correspondiente a compuestos posiblemente carcinógenos en humanos (con bajo grado de evidencia), se han incluido los siguientes HAPs (figura 2):

- benzo[b]fluoranteno
- benzo[k]fluoranteno
- indeno1.2.3[c,d]pireno
- dibenzo[a,e]pireno
- dibenzo[a,h]pireno
- dibenzo[a,i]pireno
- dibenzo[a,e]pireno.

Figura 2: Estructuras químicas y nombres de HAPs clasificados por la IARC en los grupos 2A y 2B



Algunos HAPs pueden ser activados por diversos sistemas enzimáticos, hasta formas altamente carcinogénicas, como los dioles-epóxidos. Según lo descrito, la formación de estos últimos es dependiente de la presencia de la región bahía en el HAP (Borgen y cols., 1973; Sims y cols., 1974) y además, investigaciones recientes demuestran que la región K de los HAPs puede ser metabólicamente activada por CYP1A1 humana recombinante (Nesnow y cols., 2000). Los HAPs activados son capaces de interactuar covalentemente con el ADN, formando aductos. De preferencia, esta reacción se produce entre el carbono bencílico del epóxido y los grupos amino de los residuos de deoxiadenosina y deoxiguanosina en el ADN, siendo los aductos con esta última base los más frecuentes (Dipple, 1994; Jerina y cols., 1990). Esta situación adquiere mayor relevancia si consideramos que muchos genes supresores de tumores, como P-53 tienen regiones ricas en secuencias G-C.

METABOLISMO DE LOS HAPs

- **Reacciones de Fase I**

Las reacciones de la fase I tienen como objetivo principal convertir sustancias xenobióticas altamente hidrofóbicas (como los HAPs) en compuestos más solubles, mediante la adición de grupos funcionales, tales

como: -OH, -SH, -NH₂, -COOH, etc. Este cambio de polaridad facilita que los metabolitos sean eliminados en forma natural o mediante la acción de enzimas de la fase II. Las principales reacciones de la fase I son: oxidaciones (hidroxilaciones alifáticas y aromáticas, epoxidación, N- O- S- desalquilación, desaminación, N- hidroxilación, sulfoxidación, desulfuración, deshalogenación oxidativa, etc.), reducciones (azo y nitro-reducción aromática, dehalogenación reductiva), hidrólisis, hidratación, isomerización, entre otras (Gibson y Skeet, 1986).

Uno de los sistemas enzimáticos más importantes en la fase I es el sistema de oxidodasas de función mixta (MFO), citocromo P-450 – dependiente. Este sistema se encuentra en varios tejidos, pero es particularmente activo en el hígado. Las reacciones catalizadas por MFO requieren de oxígeno molecular y NADPH (Gibson y Skett, 1986).

En la fase I participan también otras enzimas como la epóxido-hidrolasa, una enzima hidrolítica que se encuentra localizada en la membrana, cerca de las monooxigenasas P-450. Esta enzima cataliza la hidratación de epóxidos alifáticos y aromáticos, generando dioles menos reactivos. Además otras enzimas hidrolíticas como esterasas y amidasas, participan en la fase I, modificando en los xenobióticos los grupos funcionales preexistentes.

- **Reacciones de fase II**

La fase II consiste principalmente en reacciones de conjugación con diversas moléculas como por ejemplo: ácido glucurónico, grupos sulfato, metilo y acetilo, aminoácidos, glutatión, etc. (Gibson y Skett, 1986). Las reacciones de la fase II son biosintéticas y requieren energía para que la reacción ocurra. Esto se realiza activando los co-factores o el sustrato a intermediarios de alta energía.

- **Reacciones de fase III**

Las reacciones de la Fase III son aquellas involucradas en el transporte de las sustancias conjugadas derivadas de la Fase II al exterior de la célula.

La figura 3 resume las reacciones involucradas en el metabolismo de los HAPs y otros compuestos xenobióticos.

Figura 3: Esquema de biotransformación de xenobióticos



En la figura. P450: citocromo P-450, GST: Glutación S-transferasa, NAT: N-Acetiltransferasa, GT: glucoronosiltransferasa

CITOCROMO P-450

La super-familia de P-450 está constituida por una gran cantidad de familias e isoenzimas, que se ubican principalmente en el retículo endoplasmático. Estudios de biología molecular indican que la familia de las isoenzimas P-450 comprende alrededor de 480 genes diferentes (Nelson, 1996). Tienen, en promedio, un peso molecular entre 45.000-55.000 Da. El nombre de citocromo P-450 deriva de la capacidad, en su forma reducida, de formar un complejo con monóxido de carbono, caracterizado por una banda de absorción a 450 nm.

El conocimiento de la estructura primaria de P-450, a partir del cADN ha permitido acordar una nomenclatura internacional, que ha sido dividida en:



- **Familia** (numero indoarábigo): más de un 40% de homología en las secuencias (70 familias).
- **Sub-familia** (letra): más de un 60% de homología en la secuencia (127 subfamilias).
- **Isoforma** (número indoarábigo).

En el ser humano se conocen 49 tipos de citocromos P-450, repartidos en trece sub-familias. Existen en la actualidad cuatro familias, con sus sub-familias e isoformas correspondientes, que son capaces de metabolizar compuestos endógenos y exógenos, entre ellos, xenobióticos (Directory of P450-containing Systems, 2001, tabla 2).

El citocromo P-450 es el lugar de unión del oxígeno en el sistema MFO. Es una hemoproteína que tiene como grupo prostético la protoporfirina férrica IX (Gibson y Skett, 1986, figura 4). La modificación cíclica de la valencia del hierro en este grupo, le permiten a las proteínas del tipo P-450 transferir electrones.

La reacción general que catalizan los citocromos P-450 es:

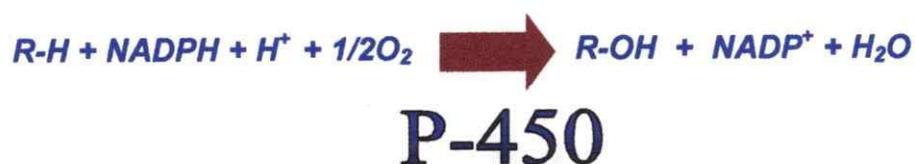
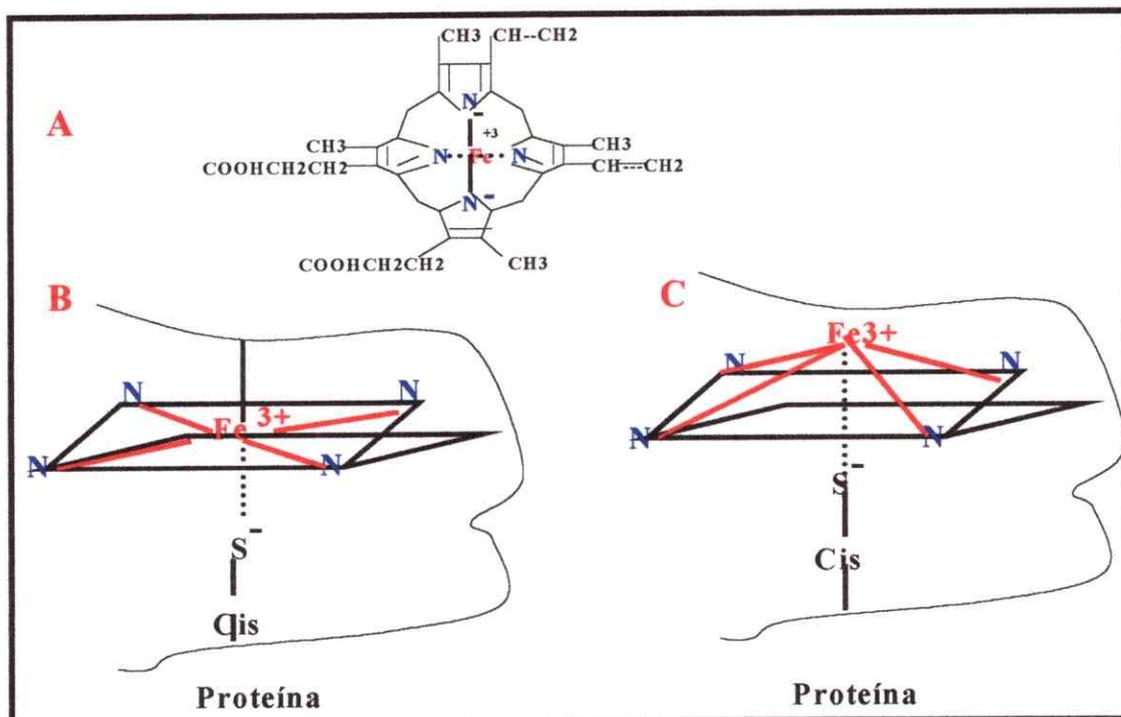


Tabla 2: Distintos tipos de citocromos P450s humanos involucrados en el metabolismo de xenobióticos.

Familia de P-450	Sustratos específicos	Sub-Familia	Isoformas (N° aa)	N° de exones (Peso molecular) cromosoma	Pseudogenes
1	HAPs, cafeína	1 ^a	1A1 (512) 1A2 (515)	7 (58.294) 15 7 (58.165) 15	
	Drogas, esteroides, glaucoma congénito	1B	1B1 (543)	-(60.831) 2	
2	Esteroides, cumarina	2 ^a	2A6 (494) 2A7 2A13	9 (56.541) 19	2A7P telomérico 2A7P centromérico
	Drogas	2B	2B6 (491)	9 (56.278) 19	
	Drogas, esteroides	2C	2C8 (490) 2C9 (490) 2C18 (490) 2C19 (490)	9(55.824) 10 9(55.574)10 9(55.740)10 9(55.945)10	
	Antidepresivos tricíclicos, β- bloqueadores, antiarrítmicos, antipsicóticos, éxtasis	2D	2D6 (497)	9 (55.801) 22	2D7P 2D8AP 2D8BP
	Alcohol, Solventes orgánicos, tóxicos	2E	2E1 (493)	9 (56.849) 10	
	3- metilindol	2F	2F1 (491)	9 (55.499) 19	2F1P
	Ácido araquidónico	2J	2J2	-(57.653) 1	
3	Drogas (50%), taxol, ciclosporina A, esteroides, nifedipina, lovastatina, diazepam, terfenadina	3 ^a	3A4(502) 3A5(502) 3A7	9 (57,299) 7 9 (57,108) 7	3A5P1 3A5P2
4	Metabolismo de ácidos grasos	4 ^a	4A9 (519) 4A11 (519)	-(59,347) 1	
		4B	4B1 (511)	11(59,019) 1	
	Leucotrienos (LTB4)	4F	4F2 (520) 4F3 (520)	-(59,805) -	

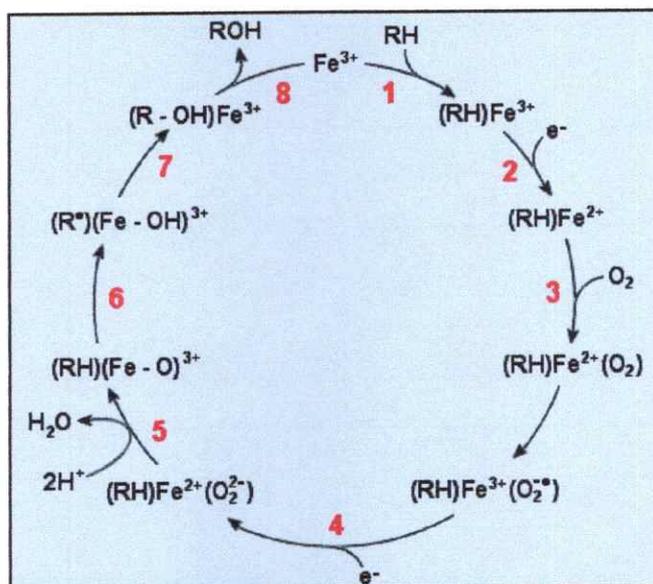
Figura 4: Estructura del Grupo Prostético de Citocromo P450.



En la figura: **A.** Hierro en anillo porfirínico IX, **B.** Fe^{3+} hexa-coordinado, hierro planar, en el grupo hemo en el citocromo P450; **C.** Fe^{3+} penta coordinado, hierro fuera del plano, en el grupo hemo en el citocromo P450.

La oxidación de agentes xenobióticos (entre ellos los hidrocarburos aromáticos policíclicos) mediada por el citocromo P-450 ocurre en forma cíclica, tal como se muestra en la figura 5.

Figura 5: Ciclo catalítico de P-450.



En la figura: **1)** Fijación del sustrato en el sitio catalítico, **2)** Reducción de 2 flavinas de la NADPH P450 reductasa y transferencia de 1 electrón, **3)** Fijación de una molécula de oxígeno, **4)** transferencia de un segundo electrón, **5)** ruptura del enlace O-O e incorporación de un átomo de O en una molécula de H₂O, **6)** activación del sustrato, **7)** transferencia del segundo átomo de O al sustrato, **8)** Disociación y liberación del producto

La secuencia de reacciones que ocurren en este proceso puede resumirse de la siguiente forma:

1. El primer paso es la unión del compuesto xenobiótico a la forma oxidada (férrica) del citocromo. Existen muchos compuestos, tanto endógenos (hormonas, ácidos grasos, etc.) como exógenos (drogas, contaminantes ambientales) capaces de servir como sustrato a P-450.

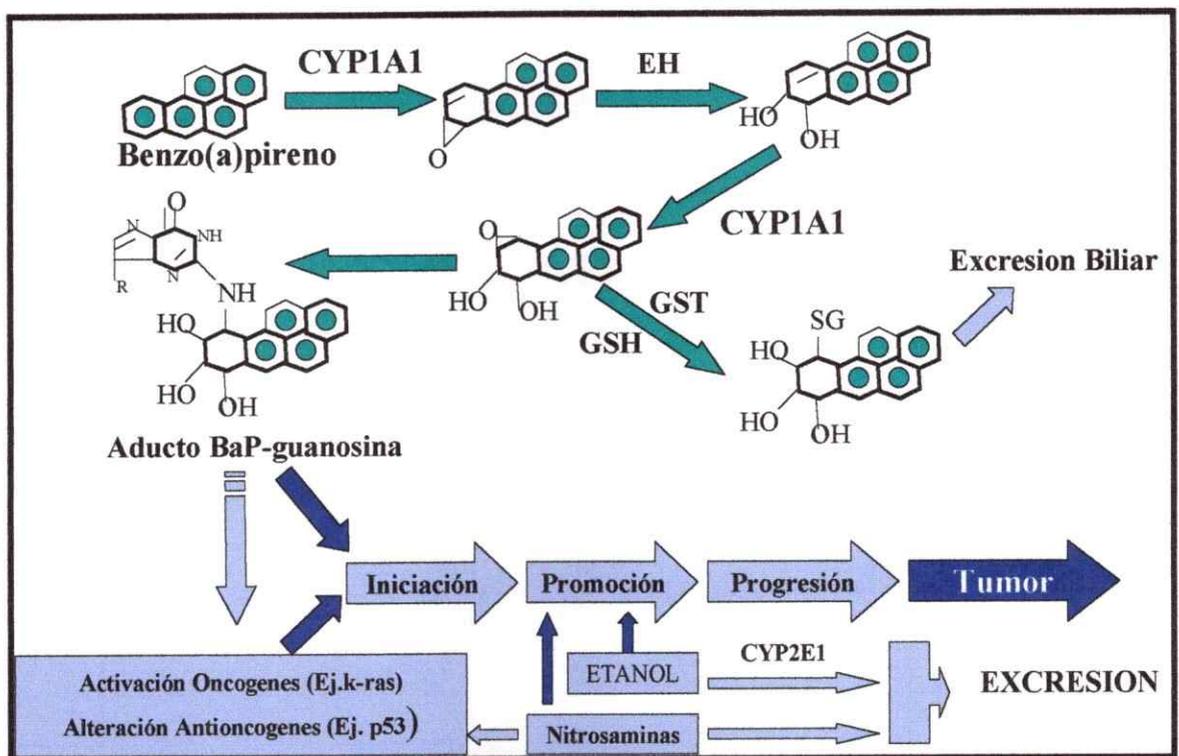
2. La segunda etapa corresponde a la reducción del complejo sustrato-P450 férrico a la forma ferrosa de la hemoproteína. El poder reductor proviene de $\text{NADPH} + \text{H}^+$, que se transfiere a la NADPH-citocromo P-450 reductasa y finalmente, ésta cede el electrón necesario para la reducción de P-450.
3. El tercer paso es la unión de oxígeno molecular a la forma ferrosa del complejo. Esta etapa no está caracterizada, ya que el intermediario formado es muy inestable.
4. La etapa final involucra el reacomodamiento electrónico, la inserción de un segundo electrón proveniente de la NADPH-citocromo P-450 reductasa y la formación del producto final (Taningher y cols., 1999).

Como resultado de la secuencia de reacciones de óxido reducción, se origina un sustrato oxidado. Los HAPs pueden dar origen a numerosos compuestos, dependiendo de la posición en que sean hidroxilados.

La inserción de un átomo de oxígeno molecular en la estructura del HAP (epóxido), hace que éste se transforme en sustrato para otra enzima microsomal, la epóxido hidrolasa, que transforma el epóxido en diol. Luego, el producto de la epóxido hidrolasa es metabolizado nuevamente por P-450

para producir una nueva epoxidación en las posiciones 7 y 8 del anillo, dando paso al diol-epóxido, una especie altamente reactiva, capaz de unirse covalentemente al ADN, formar un aducto e iniciar una serie de eventos carcinogénicos (figura 6).

Figura 6: Activación del Benzo[a]pireno por P-450

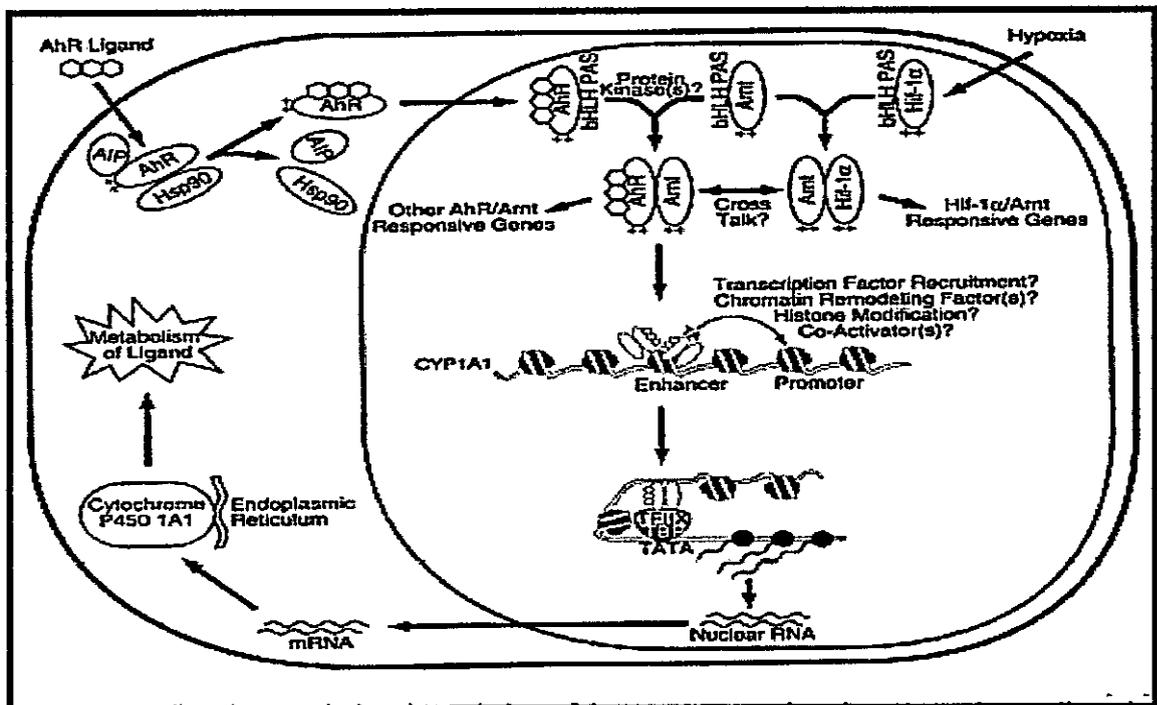


En la figura se explica el proceso de activación de HAPs, ejemplificado con el benzo[a]pireno y su posible mecanismo de carcinogenicidad. **CYP1A1**: citocromo P-450 familia 1, subfamilia A, isoforma 1, **EH**: epóxido hidrolasa, **GST**: glutatión S-transferasa, **GSH**: glutatión reducido, **BaP**: benzo[a]pireno

Algunas familias de citocromos P-450 pueden ser inducidas por diferentes compuestos como drogas, fenobarbital, o contaminantes ambientales (HAPs). La inducción por HAPs está asociada a un receptor citosólico, llamado "receptor Ah", con una alta especificidad por su sustrato. En ausencia de HAPs, el receptor Ah se encuentra asociado a una proteína llamada Hsp90 (Whitlock, 1999). Al unirse un HAP, Hsp90 se disocia, resultando en la formación de un complejo ligando-receptor Ah que tiene una alta afinidad por el ADN (Swanson y cols. 1993). Esta formación receptor-ligando HAP es capaz de unirse a una proteína llamada ARNT (*Ah receptor nuclear translocator*), lo que determina el desplazamiento desde el citosol hacia el núcleo del complejo receptor-ligando. Una vez en el núcleo, el complejo se une a regiones específicas del ADN, ubicadas en la región reguladora del gen de P450, estimulando la transcripción de éste y otros genes relacionados (Nerbert y González, 1985; Nerbert y cols. 1991), como se observa en la figura 7. Este proceso puede inducir la iniciación y promoción tumoral mediante los eventos de la cascada de la proteína kinasa C (PKC) y por aumento de intermediarios genotóxicos reactivos, como los dioles-epóxidos, que pueden llegar a producir mutaciones que activen protooncogenes (Ioannides y Parke, 1993), que inactiven antioncogenes (Denissenko y col., 1996) o que modulen la actividad del factor de crecimiento epidermal (EGF), lo que junto a la activación de la cascada de la

PKC, conduce a hiperplasia y progresión tumoral vía inmunosupresión y pérdida de la diferenciación celular (Green, 1992; Ioannides y Parke, 1993).

Figura 7: Inducción de P-450



En la figura: AhR: aryl hydrocarbon receptor, Hsp: Heat shock protein, Arnt: Ah receptor nuclear translocator, AIP: Proteína chaperona, bHLH/PAS: basic helix-loop-helix / Per-Arnt-Sim, un grupo de proteínas reguladoras de la transcripción.

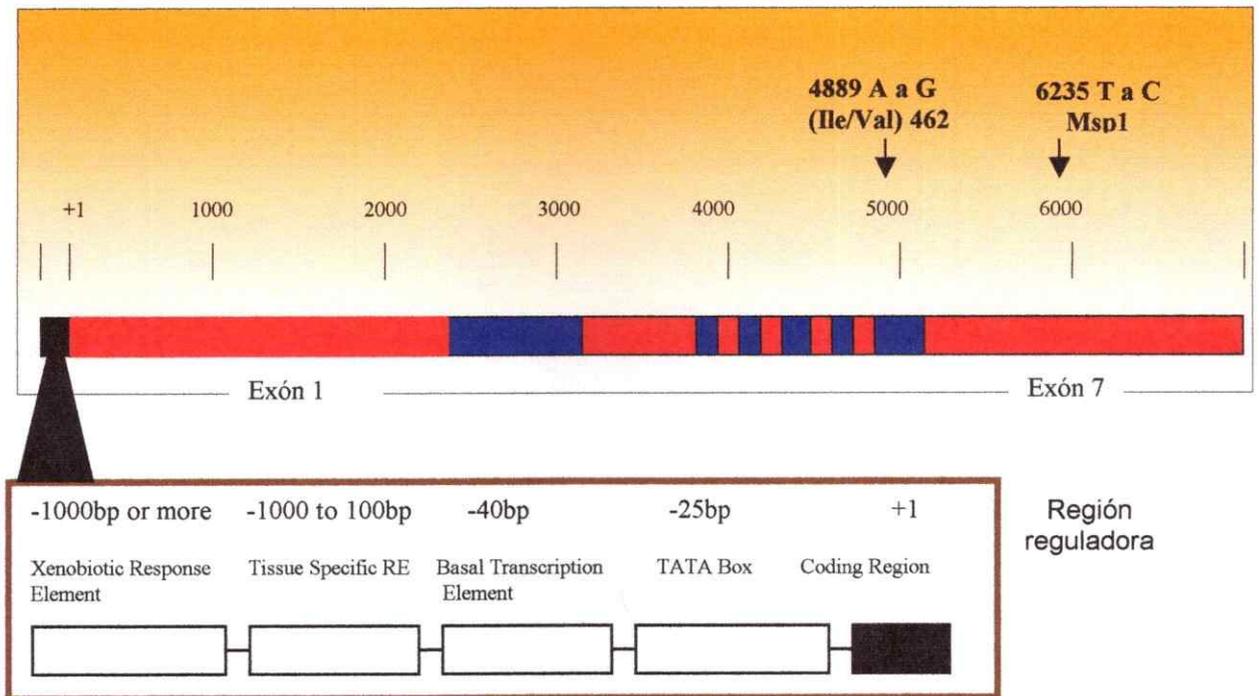
ISOFORMAS DE CITOCROMO P-450: ACTIVACIÓN DE XENOBIÓTICOS Y RELACION CON CÁNCER PULMONAR

- **CYP1A1**

Las enzimas CYP1A corresponden a una de las sub-familias del sistema de monooxigenasas. Dentro de ésta existen dos isoenzimas CYP1A1 (asociada a la actividad aril-hidrocarbón hidroxilasa) y 1A2, con más de un 70% de homología entre sus secuencias. CYP1A1 se especializa en la metabolización de HAPs, siendo una de las enzimas más importantes en su biotransformación; mientras que CYP1A2 procesa aminas y amidas aromáticas y heterocíclicas (Nedelcheva y Gut, 1994).

En humanos el gen CYP1A1 está localizado en el cromosoma 15 (q22). Tiene 5810 pb. contiene 7 exones y codifica para una enzima de 55 kDa (figura 8) .

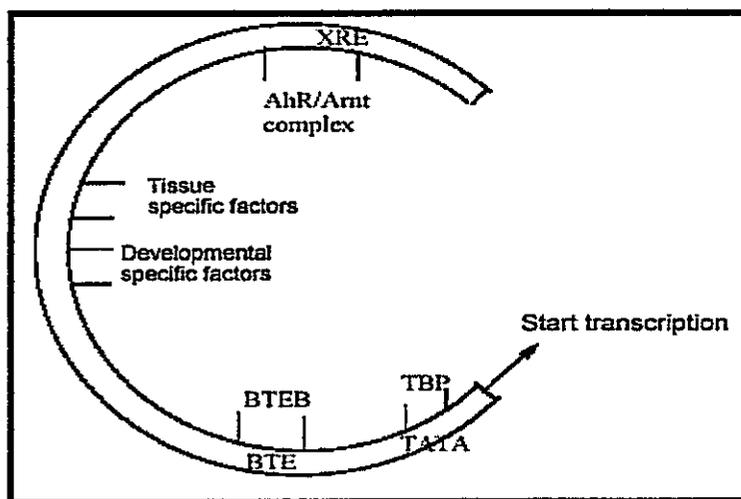
Figura 8: Estructura del gen CYP1A1



CYP1A1 puede ser inducido por diferentes compuestos xenobióticos, en especial HAPs e hidrocarburos aromáticos halogenados. Extractos orgánicos del material particulado, que contienen los HAPs y otros compuestos cancerígenos han logrado inducir la actividad de CYP1A1 (Okey y cols., 1995; Quiñones y Gil, 1995). En CYP1A1 existen “enhancers”, denominados XRE 1 y 2 (*xenobiotic-responsive element 1 y 2*), ubicados unas 1000 pb. río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Los XRE son secuencias que actúan en cis y son los responsables de la inducción por HAPs. Es justamente en estas regiones del ADN donde se une el complejo receptor

Ah-HAP-ARNT. Luego de esta unión, se forma un puente entre el heterodímero AhR-ARNT y los factores asociados a la caja TATA, lo que resulta en un reclutamiento de la RNA polimerasa (figura 9).

Figura 9: Activación transcripcional mediada por receptor. Unión a regiones reguladoras.



En la Figura:

- BTE : basal transcription factors
- BTEB : BTE-binding protein
- TATA : TATA box motif
- TBP : TATA box motif protein
- XRE : xenobiotic response element
- AhR : aryl hydrocarbon receptor
- Arnt : Ah receptor nuclear transcription factor

Entre los polimorfismos más importantes relacionados a la incidencia en cáncer pulmonar, se puede mencionar a Msp1, que consiste en la sustitución de una timina por una citosina, en la posición 6235, ubicada después de la señal de poli-A (Hayashi y cols., 1991), lo que genera un sitio de corte (CCGG) para la enzima de restricción Msp1. La presencia de esta mutación incrementa la inducibilidad del gen de CYP1A1 (Rannug y cols., 1995). El factor étnico podría jugar un papel muy importante en la frecuencia de esta mutación. Las menores frecuencias de este polimorfismo (cercanas a

10%) se han encontrado en individuos caucásicos (Tefré y cols., 1991; Hirvönen y cols., 1992), mientras que las poblaciones asiáticas presentan las mayores frecuencias descritas (Kawajiri y cols., 1990; Hayashi y cols., 1991; Nakachi y cols., 1991). Muñoz y cols. (1998), publicaron una frecuencia cercana al 83% en poblaciones mapuches del sur de Chile. Según lo descrito y asumiendo una mezcla racial indígena caucásico (mapuche-europeo) cercana al 40% para los estratos medios-bajos (Valenzuela, 1984; Valenzuela y cols., 1987), podría esperarse una frecuencia intermedia entre las descritas para caucásicos y mapuches en la población chilena no afectada por cáncer pulmonar.

- **CYP1B1**

Esta enzima juega un papel fundamental en la producción de intermediarios mutagénicos derivados de HAPs y estrógeno. Parece ser incluso más activo que CYP1A1 al catalizar la formación de estos intermediarios. Se ha descrito un polimorfismo en el exón 3 de esta enzima, en el dominio de unión del grupo hemo, análogo al polimorfismo presente en el exón 7 de CYP1A1, cuya frecuencia presenta diferencias étnicas significativas (Autrup, 2000).

- **CYP3A4**

Esta isoforma del citocromo P-450 es la de mayor expresión en hígado humano, alcanzando al 30% del total de citocromos P-450 en este tejido (Bartsch y cols., 2000). CYP3A4 metaboliza casi un 50% de las drogas para humanos que se comercializan actualmente (Rendic y Di Carlo, 1997; de Wildt y cols., 1999). Publicaciones recientes han descrito que un aumento en la actividad de CYP3A4 puede activar algunos HAPs, como por ejemplo, el fenantreno en individuos fumadores (Heudorf y Angerer, 2001). No se conoce con exactitud cuáles son las causas de la variación en la actividad de 3A4 en humanos.

Se han descrito algunas variantes alélicas en la región reguladora' 5' de CYP3A4 (Hashimoto y cols., 1993; Rebbeck, 1997), con una frecuencia de homocigotos de un 3.2% en caucásicos estadounidenses, 3.8% en suecos (Westlind y cols., 1999) y 4.2% en blancos (Sata y cols., 2000). Algunos estudios posteriores indican que este polimorfismo (CYP3A4-V) aumenta la transcripción de CYP3A4 en las líneas celulares HepG2 y MCF7 (Amirimani y cols., 1999).

CYP3A4 en humanos puede ser inducido por dexametasona, nifedipina, rifampicina, clotrimazol, progesterona, estradiol, corticosteroides y

fenobarbital. La inducción se produce a nivel de receptor de esteroides-enobióticos (SXR), ubicada en la zona reguladora río arriba de la secuencia de CYP3A4.

La actividad de CYP3A4 puede determinarse por la cuantificación de los niveles de 6- β -hidroxicortisol en la orina. Este es un metabolito polar no conjugado del cortisol y que se forma en el retículo endoplásmico de hepatocitos, bajo el control de CYP3A4, siendo luego excretado principalmente a través de la orina.

La excreción de 6 β -hidroxicortisol no varía con el sexo, pero disminuye con la edad y aumenta en las mujeres embarazadas. Algunas enfermedades renales como el síndrome de Cushing, puede aumentar hasta en un 4000 % la excreción de este metabolito. La eliminación por la orina también se ve afectada por el uso de drogas inhibitoras y estimuladoras de CYP3A4.

GLUTATION-S-TRANSFERASA CLASE-MU, TIPO 1 (GSTM1)

Las glutatión-S-transferasas (GSTs) representan el principal grupo de enzimas de detoxificación. Las células eucarióticas poseen isoenzimas GSTs citosólicas y de membrana, cada una de ellas con actividad y especificidad

diferentes. Tienen un peso molecular entre 17 y 28 kDa. y se han clasificado en tipos alpha, pi, sigma, theta, mu y omega basándose en su estructura primaria (Mannervik y cols., 1985; Meyer y cols., 1991; Buetler y Eaton, 1992).

Las glutatión S-transferasas pertenecen al grupo de enzimas de fase II o de conjugación. Forman parte del sistema de detoxificación celular, que tiene por objetivo solubilizar las formas electrofílicas reactivas de diferentes compuestos, para evitar que interactúen con macromoléculas esenciales (Gibson y Skett, 1986). La eliminación de los conjugados se realiza principalmente por la bilis, debido a su alto peso molecular.

GSTM1 es una isoenzima altamente polimórfica. Aparte del genotipo "null" que corresponde a la delección homocigota del gen (Seidegård y Vorachek, 1988) existen por lo menos otras dos variantes alélicas que difieren en el aminoácido presente en la posición 173. La variante de carácter básico hGSTM1a contiene una lisina en esa posición, mientras que la variante ácida tiene una asparragina. Estas dos subunidades pueden dimerizar para formar isoenzimas del tipo 1a-1a, 1a-1b ó 1b-1b. que poseen actividades catalíticas similares (Widestern y cols., 1991)

GSTM1 juega un papel muy importante en una serie de procesos asociados al metabolismo celular, como envejecimiento y apoptosis, entre otros (Boyer, 1989), mantención de los niveles de vitamina C y E (Wells y cols. 1990), síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de la lipoperoxidación de membranas, transporte de aminoácidos, metabolismo de drogas y formación de leucotrienos (Ishikawa, 1992). La extraordinaria diversidad de actividades de esta enzima está asociada principalmente a su capacidad para bajar el pKa de los grupos sulfhidrilos del glutatión reducido en su sitio activo, desde pKa = 9 hasta pKa = 6.5.

Una de las funciones principales de la GSTM1 es detoxificar, mediante conjugación con glutatión reducido, los intermediarios electrofílicos de HAPs generados por la actividad de P-450, como los dioles-epóxidos. El complejo formado es eliminado principalmente a través de la bilis.

El genotipo GSTM1 "null" estaría asociado con un incremento en el riesgo a cáncer pulmonar en cierto tipo de poblaciones (Seidegård, 1988). Se ha reportado un aumento en los niveles de aductos HAP-deoxiguanosina (Kato y cols., 1995). Por otro lado, la presencia intacta del gen GSTM1 mostró ser protectora frente a daño citogenético inducido por agentes químicos (van Poppel y cols., 1992) y a la formación de aductos de ADN (Liu y cols., 1991).

Existe una amplia gama de compuestos que son capaces de inducir la expresión de GST, entre ello se pueden mencionar los HAPs, antioxidantes fenólicos, arsénico trivalente, barbitúricos, glucocorticoides sintéticos, etc. (Hayes y Pulford, 1995). Se ha propuesto que los HAPs aumentarían la expresión del gen de GSTM1 interactuando con secuencias de ADN, similares a las XRE en el modelo de inducción de CYP1A1 (Rushmore y cols., 1990). Las secuencias XRE que se han identificado en genes de distintos tipos de glutatión S-transferasas muestran un alto grado de homología con los de CYP1A1, lo que sugiere que un mecanismo similar puede actuar en la activación de ambos genes.

Al igual que en las otras mutaciones mencionadas, la frecuencia de la delección de GSTM1 depende de la etnia en que se estudie. El rango en que fluctúa la frecuencia de esta condición varía a entre un 30-90% en diferentes razas (Lin y cols., 1994; Rebbeck, 1997).

HIDROXIPIRENO COMO MARCADOR DE DOSIS EFECTIVA DE HAPs

La exposición a HAPs puede ser monitoreada con diferentes biomarcadores, como: metabolitos en orina, tioéteres urinarios, mutagenicidad urinaria, aductos de proteínas y aductos de ADN. Los tres primeros métodos son

indicadores no específicos de exposición, mientras que los aductos indican exposición e interacción directa entre derivados de HAPs y macromoléculas (Jongeneelen, 2001)

Un metabolito específico del pireno, el 1-hidroxipireno, fue propuesto como biomarcador de exposición reciente a HAPs en humanos (Jongeneelen y cols., 1985). Experimentos *in-vitro* en fracciones de hígado humano sugieren que la formación del 1-OHP es un buen indicador de la activación de agentes pre-mutagénicos, como los HAPs, provenientes de alquitrán (Jongeneelen y cols., 1988). En la orina de pacientes con psoriasis se encontró una buena correlación entre la presencia de 1-OHP y mutagenicidad urinaria (Clonofero y cols., 1989). Actualmente, y con numerosas publicaciones que avalan su uso, el 1-OHP urinario es uno de los principales indicadores biológicos de exposición a este tipo de contaminantes ambientales genotóxicos (Jongeneelen, 2001)

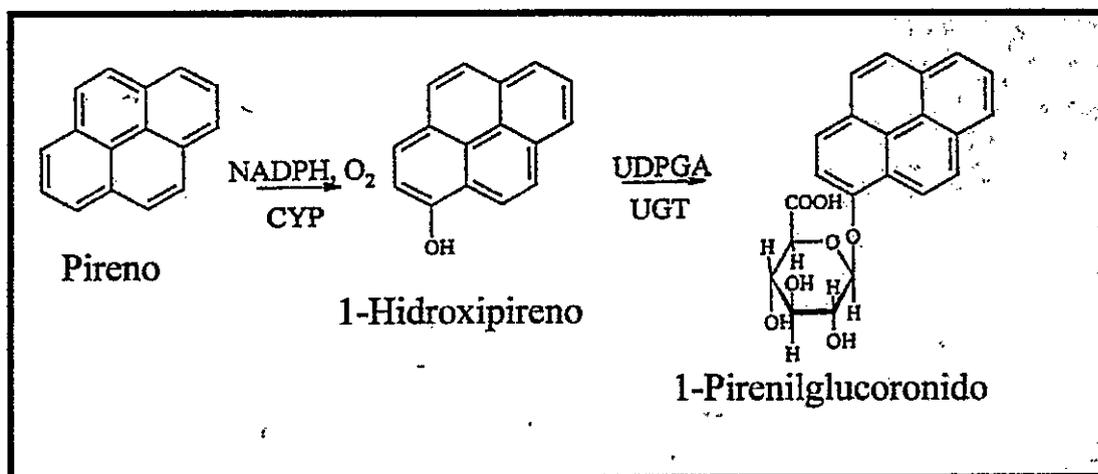
El pireno es un HAP de 4 anillos aromáticos, de alto peso molecular, que no ha sido catalogado como cancerígeno para humanos. Es uno de los principales componentes en la mezcla de HAPs presentes en el ambiente (WHO, 1983) y está asociado con la presencia de HAPs de alto potencial cancerígeno y/o mutagénico. La exposición a pireno se debe principalmente

a la inhalación del humo de cigarrillo, aire contaminado e ingesta de alimentos ahumados o muy asados.

El pireno siempre está presente en las mezclas de HAPs. Sin embargo la proporción de éste varía según las diferentes fuentes. Mediciones comparativas de HAPs en material particulado de un sitio de trabajo en particular muestran que la contribución relativa de cada HAP es relativamente constante, pero la proporción relativa de pireno en los perfiles de HAPs de diferentes sitios difieren significativamente (König y cols., 1985; Lesage y cols., 1987). Esta variación en la proporción del pireno hace necesarios los análisis de aire en los lugares donde están los trabajadores a los que se les está cuantificando el 1-OHP.

El metabolismo del pireno se realiza principalmente por oxidación en los enlaces 1-2 y 4-5, siendo el 1-hidroxipireno el principal metabolito producido. El 1-OHP es sustrato para la UDP-glucuronosiltransferasa una enzima que cataliza la conjugación entre 1-hidroxipireno y ácido UDP-glucurónico. El compuesto resultante es el 1-pirenilglucoronido, que posteriormente es eliminado por la orina disminuyendo así la toxicidad del pireno y sus derivados (figura 10). Al incubar el 1-pirenilglucoronido con la enzima β -glucuronidasa, se libera el 1-hidroxipireno, lo que permite su detección por HPLC (Luukkanen y cols., 2001)

Figura 10: Metabolismo del pireno en humanos



El potencial analítico para 1-OHP es inmenso, ya que los resultados obtenidos son consistentes independiente de las variaciones metodológicas. Se ha comunicado que el tratamiento inicial de las muestras de orina con calor y ácidos fuertes para hidrolizar los conjugados del 1-OHP, no aumenta la cantidad del metabolito libre (Keimig y cols., 1983). La hidrólisis enzimática con una mezcla de glucuronidasa y sulfatasa es suficiente y efectiva para medir la cantidad total de 1-OHP urinario presente en una muestra.

Para normalizar los niveles de 1-OH pireno encontrados en cada paciente, se utiliza la creatinina. Uno de los precursores de la creatinina, la creatina, se sintetiza en el riñón, hígado y páncreas (Tietz, 1986). Es transportada vía sanguínea a otros destinos, como músculo y cerebro, donde es fosforilada a

fosfocreatina. Una parte de la fosfocreatina es transformada en creatinina en cantidad constante y proporcional a la masa muscular. Así, la creatinina, en ausencia de afecciones renales, es excretada por la orina en forma constante, por lo que puede ser utilizado como referencia de la concentración de otras sustancias de la orina.

INCIDENCIA DEL ARSENICO EN CANCER PULMONAR EN LA POBLACIÓN DE LA SEGUNDA REGION DE CHILE

La segunda región del país es una de las zonas mineras de mayor importancia en el mundo. La ciudad de Antofagasta, la capital de esta región, tiene aproximadamente 260.000 habitantes y está situada a 1300 kms. al norte de Santiago. Uno de los hechos que llama la atención es que la tasa de cáncer pulmonar es la más elevada del país con un valor de 35/100.000 habitantes lo que corresponde a casi tres veces la tasa nacional (13/100.000) (Fuente: Ministerio de Salud, 1996).

La principal fuente de agua potable de toda la segunda región son los ríos, que al originarse en la cordillera de los Andes, contienen altas concentraciones de arsénico en forma natural. Además, el arsénico es uno de los desechos en la extracción de cobre por parte de las minas que se

ubican río arriba de Antofagasta. Según datos de CODELCO, las emisiones mineras de arsénico al aire en Chuquicamata alcanzaron un valor promedio de 25 toneladas/día, aunque a partir de 1989 éstas han disminuido aproximadamente a 15 toneladas/día, debido a estrategias de control de la contaminación del aire (CODELCO-Chuquicamata, 1993). Todos estos factores han mantenido a gran parte de la población de la II región expuesta a altos niveles de arsénico en el agua potable durante muchos años (tabla 3).

ESTADISTICAS DE CANCER EN LA SEGUNDA REGION DE CHILE

La segunda región del país presenta la tasa nacional más alta de mortalidad por cáncer. En 1998 en la región se registraron 577 defunciones atribuidas a tumores malignos, presentando la ciudad de Antofagasta una de las mayores tasas de mortalidad (más de 150 por cada 100.000 habitantes). Por otra parte las tasas de morbilidad asociada a tumores malignos en el 2000 superaron los 1.100 casos, siendo la tasa de la ciudad de Antofagasta mayor a doscientos casos por cada cien mil habitantes.

Según el Registro Nacional de Cáncer (Registro Nacional del Cáncer, 2000), el cáncer bronco-pulmonar es la primera causa de muerte por cáncer en la II

Tabla 3: Concentración de arsénico (µg/litro) en agua potable para las principales ciudades y pueblos de la segunda región, desde 1950 a 1994, con intervalos de 5 años, y promedios de población según el censo de 1991 (adaptado de Smith, 1998)

CIUDAD O PUEBLO (POBLACION 1991)	1950- 1954	1955- 1959	1960- 1964	1965- 1969	1970- 1974	1975- 1979	1980- 1984	1985- 1989	1990- 1994
Antofagasta (219.310)	90	870	870	870	260	110	80	60	40
Mejillones (6.134)	90	870	870	970	260	110	80	60	40
Calama (100.283)	120	120	120	120	240	230	110	80	40
Chuquicamata† (17.414)	250	150	130	130	130	110	80	60	10
Tocopilla (21.039)	250	250	250	250	520	460	110	80	40
María Elena (15.470)	250	250	250	250	520	460	110	80	40
Taltal (7.620)	60	60	60	60	60	60	60	60	60
San Pedro ‡ (3.070)	600	600	600	600	600	600	600	600	600
Nivel promedio de As (390,340 habitantes)	123	569	568	568	272	176	94	71	43

- Excepto donde se indica, el promedio en los niveles de agua fueron obtenidos de la Empresa Servicios Sanitarios de Antofagasta para el período 1950-1967 y del Servicio de Salud Antofagasta para el lapso 1968-1994.

† Datos proporcionados por CODELCO Chile.

‡ Datos para el Río Vilama, la principal fuente de agua del pueblo.

región (27.4% de las muertes). La frecuencia de casos es de 28.55 por cada 100.000 habitantes, con una relación 3:1 entre hombres y mujeres: En el año 1999 se produjeron 132 muertes por este tipo de cáncer.

Se ha demostrado que existe una asociación significativa entre exposición a arsénico e incidencia de cáncer que afecta a la vesícula, riñón, hígado, pulmón y piel. (IARC 1980; Chen y cols., 1992; Chiou y cols., 1995). Las tasas de mortalidad por cáncer asociados a arsénico han sido las más altas en el país durante el periodo 1950 - 1992. Las mayores tasas de la II región corresponden a cáncer de: vesícula, riñón, laringe, hígado, piel y pulmón. También se ha descrito que la ingesta crónica de arsénico inorgánico causa alteraciones a la piel, como queratosis, hiperpigmentación y otras alteraciones cutáneas (Smith y cols., 1998).

ARSENICO: MECANISMOS DE ACCION

El arsénico (As) es un metaloide que se puede encontrar en forma natural en el suelo, agua o tierra. También es un subproducto de la extracción de cobre y plomo, entre otros. El arsénico es utilizado como agente terapéutico, en el tratamiento de la psoriasis, enfermedades protozoarias, etc. Incluso se ha

descrito la utilidad del trióxido de arsénico (As_2O_3) en el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (Chen y cols., 1997)

Existe una gran cantidad de información que demuestra el potencial carcinogénico del arsénico, principalmente en pulmón y piel (WHO, 1981; Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1989; IARC, 1987; EPA, 1988), pero el mecanismo por el cual el arsénico ejerce su acción carcinogénica es aún desconocido debido, entre otros factores, a que no existen muchos modelos en animales de experimentación para evaluar sus efectos. Sin embargo, especies radicalarias de arsénico y fundamentalmente del oxígeno (derivadas de la acción del arsénico) relacionadas con el estrés oxidativo, están vinculadas con su mecanismo de acción (Hei y cols., 1998). También se ha descrito que el arsénico puede alterar la reparación y metilación del ADN (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1993) y modificar el control de la proliferación celular. Además, el arsenito (As^{+3}) tiene la capacidad de modular la actividad del citocromo P-450 y se ha postulado que el arsenito sódico es capaz de inducir la actividad de CYP1A1 en pulmón (Albores y cols. 1995).

Se ha demostrado que el arsénico trivalente es capaz de inducir aberraciones cromosomales e intercambio de cromátidas hermanas (Barret y cols., 1989; Nakamuro y Sayato, 1981).

En ratas, la exposición a bajas concentraciones de arsénico podría depletar el reservorio celular de S-adenosilmetionina (SAM), lo que resulta en una hipometilación general del ADN, afectando la expresión de una gran cantidad de genes (Ho Soon y cols., 2001). Utilizando técnicas de microarray en líneas celulares expuestas a arsénico, se determinó que de 588 genes estudiados, 80 sufrieron aberraciones en su expresión. Estos genes están involucrados principalmente en la regulación de ciclo celular, transducción de señales, respuesta al stress, apoptosis, producción de citoquinas, factores de crecimiento y receptores de hormonas, además de varios oncogenes (Chen y cols., 2001). También se ha descrito que la sobreexpresión de oncogenes como *c-myc*, *c-met*, ErbB2 y *c-K-ras*, está asociada con transformaciones malignas inducidas por arsénico (Zhao y cols., 1997; Chen y cols., 2001).

En cultivos de células humanas, la exposición a arsénico puede provocar tanto una hipo como una hipermetilación del ADN (Xiaoyan y Mass, 2001). Se ha comunicado que en células humanas de pulmón que habían sido expuestas en cultivo a arsenito durante dos semanas, la región promotora de P-53 estaba alterada. En líneas celulares de riñón (UOK) y pulmón (A549)

cultivadas en presencia de arsenito, se detectó la presencia de regiones diferencialmente metiladas (hipo e hipermetiladas) en la zona 5' de genes supresor de tumores, que se sabe son silenciados por metilación (Xiaoyan, 2001).

BIOTRANSFORMACION DEL ARSENICO

Tradicionalmente se ha postulado que la reducción de arsenato (As^{+5}) a arsenito (As^{+3}) se realiza sólo por vía química (sin intervención de enzimas) utilizando glutatión, pero estudios recientes señalan que la biotransformación del arsénico inorgánico en mamíferos también puede ser catalizada principalmente por tres actividades enzimáticas (figura 11):

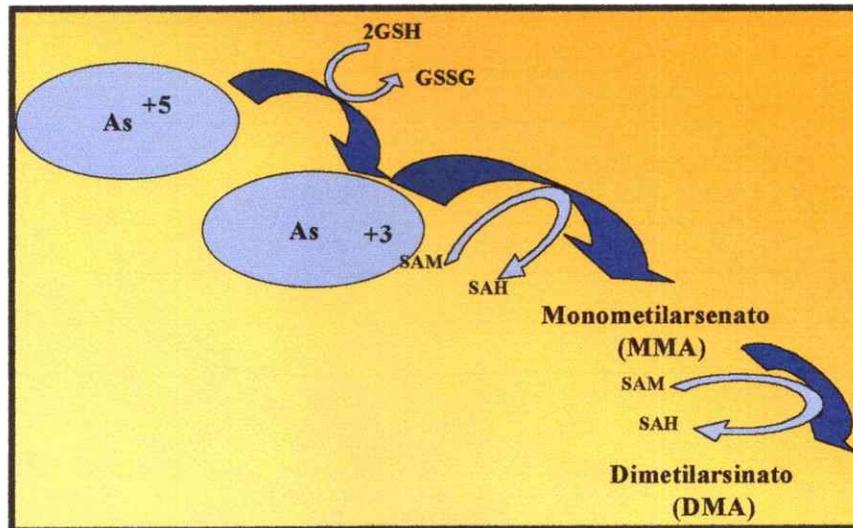
1. **Arsenato reductasa:** Esta enzima ha sido recientemente aislada y caracterizada en hígado humano. Es la encargada del primer paso en la biotransformación del arsénico: la reducción de arsenato a arsenito. Tiene un peso molecular putativo de 72kDa y requiere de un grupo tiol y un cofactor termosestable para su actividad. El posible dador del grupo tiol es el ditiotreitól (DTT), mientras que el cofactor es una molécula de menos de 3kDa (Radabaugh y Aposhian, 2000). Esta enzima no reduce ácido monometilarsónico (MMAV).

2. **Arsenito metiltransferasa:** Dos isoenzimas de arsenito metiltransferasa han sido purificadas. Su función es metilar al arsenito para formar ácido monometilarsónico (MMA). En el proceso de metilación del arsenito, la S-adenosilmetionina (SAM) es el dador de grupos metilo (Aposhian y cols., 1997)

3. **Monometilarsonato metiltransferasa:** El sustrato de esta enzima es el MMAIII (ácido monometilarsenoso) y su acción genera ácido dimetilarsínico (DMA). Se ha descrito la presencia de esta enzima en hepatocitos humanos. Existe también una MMAV-reductasa, que ha sido purificada de hígado de conejo y es el paso limitante en la biotransformación del arsenito en este sistema. Esta enzima necesita GSH para su actividad. Se ha descrito que esta enzima también estaría presente en hígado humano. Tiene una secuencia similar a la glutatión S-transferasa clase omega humana (hGSTO1-1). Presenta actividad MMAV reductasa, con Km y Vmax similares a la MMAV reductasa aislada de hígado, por lo que se propone que ambas proteínas son idénticas (Zakharyan y cols., 2001).

Se ha descrito también que la metilvitamina B-12 (metilcobalamina, CH₃B₁₂), en la presencia de tioles y arsenito, es capaz de producir grandes cantidades de MMA y algo de DMA en ausencia de actividad enzimática.

Figura 11: Biotransformación del arsénico



Algunas investigaciones señalan que tanto los compuestos de arsénico trivalente mono y dimetilados, derivados del proceso de biotransformación del arsénico, son más citotóxicos, más genotóxicos e inhibidores más potentes de la actividad de algunas enzimas que otras formas del arsénico (Thomas y cols., 2001). En este caso, la metilación del arsénico sería un proceso de activación más que de detoxificación

El ingreso y la salida del arsénico del medio celular podrían involucrar diferentes interacciones, dependiendo de las especies que deben ser transportadas. En el caso del arsenato, podría interactuar con el cotransportador Na/Pi . La familia de transportadores *MRP* (*multidrug*

resistance protein) juega un papel importante en la salida de compuestos conjugados con glutatión del medio celular. En células expuestas crónicamente a arsénico, la expresión de los genes MRP1 y MRP2 aumenta, observándose una menor acumulación intracelular de arsénico y disminuyendo así los efectos tóxicos de éste, ya que incrementan la salida de los conjugados arsénico-GSH (Liu y cols., 2001).

CONTAMINACION AMBIENTAL EN LA SEGUNDA REGION

La población de la II Región, especialmente en ciudades con alta actividad comercial e industrial, como Antofagasta, podría haber estado expuesta a otros tipos de agentes cancerígenos, diferentes a As, entre los que se incluyen: metales, compuestos orgánicos volátiles (COV), HAPs y nitro-HAPs.

Si bien los niveles de contaminantes ambientales no llegan a ser tan altos como los registrados en Santiago, el incremento en el número de automóviles y taxis colectivos, la incorporación de vehículos viejos de locomoción colectiva, el desarrollo de la pequeña y mediana industria y el aumento de la actividad portuaria, podrían estar contribuyendo a incrementar la concentración de compuestos orgánicos cancerígenos en el material particulado del aire. Trabajos de investigación han demostrado que el

material particulado de diferentes ciudades contiene HAPs y otros compuestos orgánicos cancerígenos, que contribuyen con potencial mutagénico de éste (IARC, 1983, Adonis y Gil, 1993, Gil y Adonis, 1996).

Esto hace pensar, que al igual que en Santiago, los polimorfismos en genes que codifican para enzimas de biotransformación de fase I y II, podrían jugar un importante rol en las altas tasas de cáncer pulmonar y de vías respiratorias que se registra en esta zona.

El riesgo de cáncer pulmonar podría estar relacionado con la exposición a distintos tipos de agentes cancerígenos ambientales, tanto orgánicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos y compuestos similares) como inorgánicos (arsénico y otros metales). Existen muy pocas investigaciones destinadas a estudiar las interacciones entre este tipo de agentes por lo que imperiosamente se debe generar nuevo conocimiento en este tema y aplicar tecnologías de punta en la investigación.

DETECCION DEL ANTIGENO DR-70 COMO BIOMARCADOR DE CANCER PULMONAR

El cáncer pulmonar es una enfermedad súbita y asintomática, por lo que la detección precoz es uno de los factores más importantes que determinan la sobrevida del paciente.

El antígeno DR-70 es un octapéptido producto de la degradación proteolítica de fibrina por enzimas secretadas en células tumorales en crecimiento y en metástasis. El incremento en la cantidad de la enzima proteolítica liberada por los tumores contribuye directamente a la capacidad invasora y es utilizada como marcador tumoral. Por lo tanto, una medición ya sea de la cantidad de proteasa liberada o de productos de la degradación proteica debido a la acción de la proteasas se puede utilizar para detectar la presencia de células cancerosas.

Recientemente, se ha desarrollado un "kit DR70", que permite medir por técnicas inmunológicas (ensayo ELISA) la cantidad de productos obtenidos de las reacciones catalizadas por las enzimas proteolíticas de tumores. De este modo el sistema proporciona una detección más temprana que la que permiten los métodos que miden directamente las enzimas proteolíticas, puesto que los productos de degradación se encuentran en concentraciones

mayores.

El primer estudio que avala la utilización de DR-70 como marcador tumoral fue presentado por Justice y cols. en 1992. Ellos informaron que este marcador identificó correctamente 39 de 42 pacientes con cáncer de mama y 60 de 61 controles normales. En esta investigación, DR-70 fue más sensible que los marcadores tumorales CEA y CA15-3, utilizados en las mismas muestras. Ese mismo año (1992) Guerrero y cols., informaron que habían identificado mediante este ensayo 20 de 22 pacientes con cáncer pulmonar diagnosticado y 77 de 80 controles negativos. Entre los controles negativos se incluyeron 35 pacientes normales, 24 fumadores y 21 pacientes con enfermedad pulmonar crónica obstructiva. En China, Wu y cols. (1998), analizaron 136 pacientes con 13 diferentes tipos de cáncer y 277 individuos sanos, encontrando una asociación positiva con la patología. La sensibilidad del método fue de 87.8% para cáncer pulmonar, 92.6% para cáncer de estómago, 65.2% para cáncer de mama y 66.7% para cáncer de recto. El nivel de especificidad fue de 95 %.

En una investigación realizada por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI), en la que se estudiaron 250 controles normales, 50 pacientes con cáncer pulmonar diagnosticado y 50 pacientes con cáncer ovárico, el ensayo identificó correctamente el 80% de los pacientes enfermos

y el 84% de los controles normales. La ampliación de este estudio a una población de 481 pacientes controles, con una edad promedio de 64.6 ± 19.6 años y 244 pacientes con cáncer pulmonar de una edad promedio de 64.1 ± 10.4 años, permitió establecer que el ensayo presenta una sensibilidad de 86.5 % a una concentración de DR 70 de 3.0 ug/ml y una especificidad de 96.7% a 4.5 $\mu\text{g/ml}$. (Dr. Ronald Moore, AMDL, comunicación personal).

Otros estudios han demostrado que el ensayo identifica todos los tipos de cáncer pulmonar (en células pequeñas y en células no pequeñas). La determinación no es influenciada por el consumo de alcohol, hábito de fumar, ni por un problema pulmonar crónico obstructivo, pero en pacientes mayores de 65 años se observa un aumento natural del antígeno DR-70. Además, el nivel DR-70 se ha relacionado con el estado de la enfermedad y con la respuesta tumorigénica a terapia.

El ensayo está en etapa de prueba de campo en Canadá, Alemania y China mostrando excelentes resultados. El kit ha sido recientemente aprobado por el FDA para su uso clínico en Estados Unidos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

Biomarcadores de riesgo, susceptibilidad, exposición y enfermedades entregan información sobre los efectos en la salud humana asociados a la exposición a agentes químicos de alta toxicidad presentes en el ambiente, incluyendo cancerígenos. Su uso permitiría identificar los sujetos más sensibles a enfermedades (como por ejemplo, cáncer) dentro de una población, ya que la susceptibilidad individual a este tipo de compuestos está relacionada al nivel de exposición y a otros factores tales como los genéticos, étnicos, el estilo de vida, etc.

Objetivo general

Estudiar, en las regiones II y Metropolitana, el uso de biomarcadores para evaluar la exposición y riesgo a contaminantes ambientales

Objetivos específicos:

- Investigar las frecuencias del polimorfismo Msp1 y GSTM1 "null" en individuos de Antofagasta, Santiago y Curacaví.

- En la Región Metropolitana, investigar en individuos controles y expuestos a emisiones diesel, la posible correlación entre biomarcadores de exposición como el 1-OHP urinario, biomarcadores de riesgo (Msp1, GSTM1) y la variación en la actividad de CYP3A4.
- En individuos residentes en la II Región, correlacionar las frecuencias de polimorfismos genéticos con la susceptibilidad a cáncer pulmonar
- Evaluar el uso del antígeno DR-70 como marcador de cáncer pulmonar.

METODOLOGÍA

GRUPOS DE ESTUDIO

a) Voluntarios expuestos a emisiones diesel (87): Para estudiar la influencia de las emisiones diesel como factor de riesgo de enfermedades respiratorias, en esta investigación se examinó a un grupo de trabajadores de plantas de revisión técnica de camiones y buses, los que están altamente expuestos a los productos de la combustión de motores diesel. Se colectaron muestras biológicas (sangre y orina) de trabajadores (operarios y administrativos) de 3 plantas de revisión técnica ubicadas en el Gran Santiago: Diesel 1 (buses), Diesel 2 (camiones) y Diesel 3 (buses).

Además se estudió un grupo de vendedores (expuestos urbanos) que trabajan en las inmediaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en la avenida Independencia, que presenta un gran flujo de vehículos, especialmente de buses.

b) Voluntarios no expuestos a emisiones diesel (48): En este estudio, se ha considerado como control a un grupo de voluntarios del sector de Curacaví, una zona rural con características climáticas y geográficas similares a las de Santiago, ubicada a 50 Km de la capital, y que no presenta niveles elevados de contaminación por material particulado.

c) Pacientes con cáncer pulmonar de la II Región (57): Para estudiar el efecto de los HAPs y otros agentes cancerígenos ambientales sobre la incidencia de cáncer pulmonar en la II Región de Chile, se estudiaron pacientes con este tipo de cáncer diagnosticado por métodos histoquímicos, atendidos en el Hospital Regional de Antofagasta, pero provenientes de toda la región.

d) Individuos sanos (controles) de la II Región (101): Como grupo control en el estudio de cáncer pulmonar se eligieron individuos sin cáncer pulmonar diagnosticado, sin patologías respiratorias relacionadas y que declaran haber vivido por lo menos 10 años en la II Región.

Cada voluntario del estudio, leyó y firmó un **CONSENTIMIENTO INFORMADO** diseñado según las especificaciones del Centro de Estudios Humanísticos y Bioéticos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y que se presenta en el anexo 1.

Además, cada participante fue encuestado sobre antecedentes familiares de cáncer, hábito de fumar, contaminación intradomiciliaria y laboral, antecedentes médicos, etc. La encuesta se muestra en el anexo 2.

MATERIALES Y METODOS UTILIZADOS

- **Extracción de ADN**

Para los análisis genéticos requeridos, se utilizaron muestras individuales de ADN, las cuales fueron obtenidas a partir de muestras de sangre (aproximadamente 10 ml) donadas voluntariamente por cada persona. La toma de muestras la realizó una enfermera profesional utilizando un sistema estéril y desechable, asegurando así el mínimo riesgo tanto para el donante como para quien tomó las muestras.

La sangre fue colectada en tubos vacutainer estériles, con 0.5 ml de citrato de sodio como agente anticoagulante. Al momento de tomar las muestras, éstas fueron almacenadas en frío y luego refrigeradas en el laboratorio a 4°C. En el caso de los pacientes de Antofagasta, las muestras fueron refrigeradas y enviadas por vía aérea a Santiago, donde se almacenaron de igual forma que las otras.

La extracción de ADN linfocitos periféricos a partir de sangre total se realizó con el método del "salting out", descrito por Miller y cols. en 1988. Una vez extraído el material genético, fue lavado con etanol 70% y luego resuspendido en buffer TE. A cada muestra se le midió la absorbancia a 260

y 280 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu UV-210A, para determinar su pureza y concentración. Finalmente fueron almacenadas a -20°C . En el caso del set de muestras que estaba siendo analizadas, se mantenían refrigeradas a 4°C , para evitar el continuo congelamiento y descongelamiento que podía provocar la fragmentación excesiva del ADN.

- **Análisis por PCR (polymerase chain reaction)**

La técnica escogida para el análisis de polimorfismos genéticos fue **PCR-RFLP** (*PCR based restriction fragment length polymorphism*). El protocolo utilizado permite la detección simultánea de los polimorfismos Msp1 de CYP1A1 y de la delección del gen de la glutatión S-transferasa M1.

La detección de Msp1 se realizó de acuerdo a lo descrito por Kawajiri y cols. en 1986 y Hayashi y cols. en 1991, utilizando los partidores C44 y C47, cuyas secuencias se muestran a continuación:

C 44: 5' AAA GGC TGG GTC CAC CCT CT 3'	20 nucleótidos
C 47: 3' AAA GAC CTC CCA GCG GGC CA 5'	20 nucleótidos

El análisis para GSTM1 se realiza en la misma reacción de PCR, según lo descrito por Comstok y cols. (1990) y Ambrosone y cols. (1995). Las secuencias de los partidores utilizados para GSTM1 (G1 y G2) son:

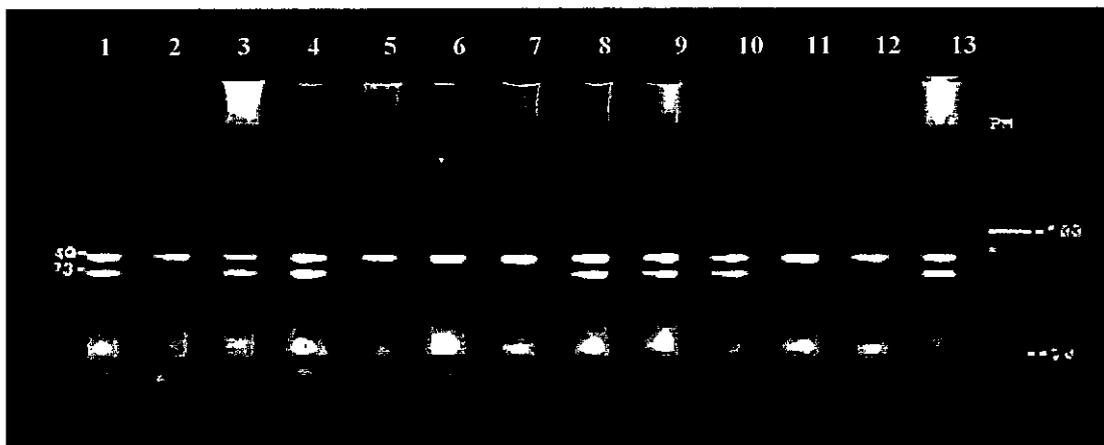
G 1: 5' CTG CCC CAC TTG ATT GAT GGG 3' 21 nucleótidos
G 2: 3' CTG GAT TGT AGC AGA TCA TGC 5' 21 nucleótidos

La amplificación se realizó utilizando termocicladores Perkin-Elmer (Gene amp PCR system 2400) y Biometra (Trio thermoblock), según si el trabajo se realizara en la *Université de Bretagne Occidentale*, ubicada en la ciudad Brest, Francia o en Santiago de Chile, respectivamente.

En el caso del análisis Msp1, luego del proceso de amplificación, se obtiene un fragmento de 340 pb. que posteriormente, es sometido a digestión con la enzima de restricción correspondiente (*Msp1*). Para GSTM1 se busca una banda característica de este gen de 273 pb. Los individuos homocigotos para la delección de GSTM1 no muestran el fragmento de 273 pb., que corresponde a la región amplificada de este gen. Los pacientes homocigotos normales y heterocigotos exhiben una banda de 273 pb., lo que indica que no existe delección del gen de GSTM1 enzima. En este ensayo no es necesario incubar con enzimas de restricción.

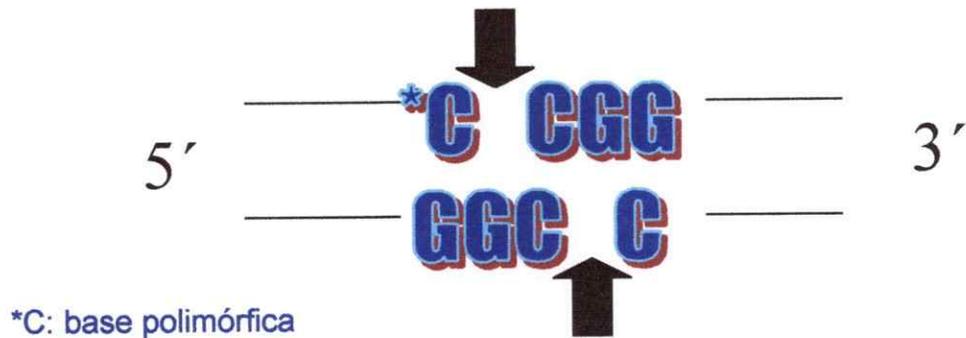
La Figura 12 muestra un gel de agarosa 2 %, teñido con bromuro de etidio (10mg/ml, Amresco, Solon, USA), utilizado como control de amplificación. Todas las muestras presentan una banda a 340 pb., que corresponde al fragmento amplificado para el análisis del polimorfismo *Msp*1. Las líneas 1, 3, 4, 8, 9, 10 y 13 presentan una segunda banda a 273 pb., lo que indica la presencia del gen que codifica para la enzima *GSTM1*.

Figura 12: Control de amplificación para *Msp*1 y *GSTM1*



Todas la muestras presentan una banda de 340 pb., lo que indica la amplificación del fragmento donde se encuentra la mutación *Msp*1. Por otro lado, los carriles 2, 5, 6, 7, 11 y 12 no presentan un segundo fragmento de 273 pb., los que demuestra la delección del gen *GSTM1*

La digestión del fragmento de 340 pb. de *CYP1A1* se realiza con la enzima de restricción *Msp*1 (Roche, 10 unidades/ μ l), que reconoce la siguiente secuencia (las flechas muestran los sitios de corte):

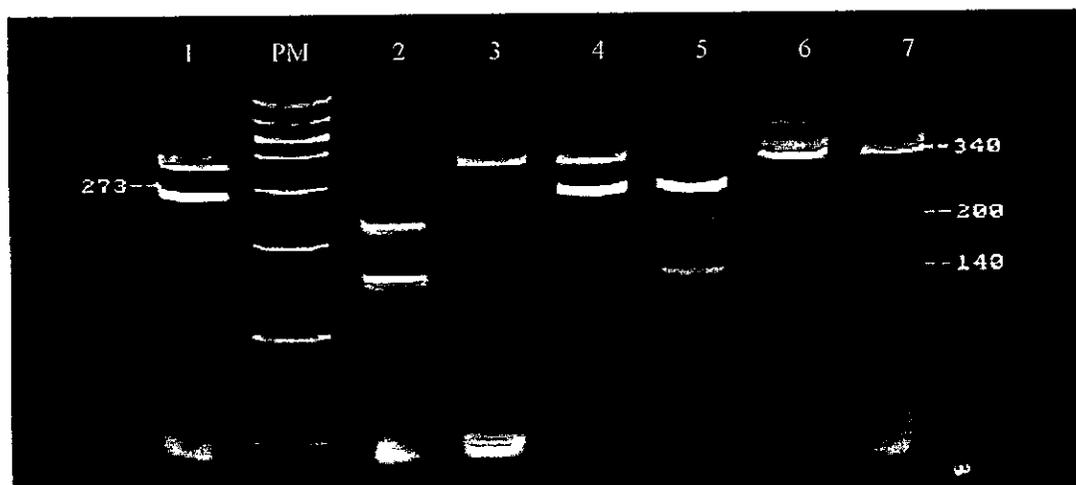


En la forma alélica normal (m1), la secuencia 5'-3' es TCGG, por lo que en ese caso no existe un sitio de restricción para *MspI*. Una transición T-*C, genera un sitio de corte para la enzima *MspI*

En el caso de homocigotos silvestres (m1m1), luego de la digestión, se encuentra una sola banda de 340 pb. (no hay sitio de corte). En los heterocigotos (m1m2) se presentan tres bandas: 340, 200 y 140 pb. (sólo un alelo sufrió el cambio de base que generó un sitio de corte). En los homocigotos mutados (m2m2), se visualizan sólo dos bandas: 200 y 140 pb.

La figura 13 muestra un análisis de digestión con *MspI* hecho en un gel de poliacrilamida 10% y teñido con bromuro de etidio.

Figura 13: Análisis de digestión Msp1



Los resultados que se visualizan en la figura 13 son los siguientes: línea 1 y 4: m1m2, GST(+); línea 2: m2m2, GST(-); línea 3 y 7: m1m2, GST(-); línea 5: m2m2, GST(+); línea 6: m1m1, GST(-). La banda de 273 pb. no se ve afectada por la digestión.

Para las electroforesis con geles de poliacrilamida se utilizó el sistema *Mini protean II vertical electrophoresis system, Biorad*. La visualización de resultados se hizo en luz UV y con la ayuda de un sistema electrónico de captura de imagen (Bio-profil, Vilber-Lourmat) o por tinción con plata.

- **Análisis Estadísticos**

Los resultados obtenidos en Santiago se analizaron usando dos paquetes estadísticos. Para el caso de la determinación de la relación del 1-hidroxi pireno con los diferentes biomarcadores genéticos (Msp1 y GSTM1) y

moleculares (CYP3A4), los datos fueron analizados por regresiones multinomiales, usando el paquete estadístico STATA 6.0.

El análisis estadísticos de datos correspondientes a los polimorfismos Msp1 y GSTM1 en la II Región, se realizó con el programa EPIDAT, versión 2.0. Para las estimaciones de las razones de disparidad, se utilizó un intervalo de confianza de 95%, calculado con el método de Maentel-Haezel, considerando un valor de significancia $\alpha=0.05$. Los intervalos de confianza de las Odds Ratio se determinaron con el sistema bootstraping.

Las pruebas estadísticas para analizar los resultados de DR-70 se hicieron mediante regresión logística, con el programa STATA, versión 6.0

- **Determinación de las concentraciones de 1- hidroxipireno urinario**

Las muestras de orina fueron colectadas en frascos estériles de poliestireno de 100ml. Cada donante recibió 3 frascos para que colectara orina según las indicaciones recibidas.

La presencia de 1-OHP en orina se determinó por la técnica de HPLC según protocolos descritos por Sing y cols. (1995); Strickland y cols. (1996) y Brzeznicki y cols. (1997), con algunas modificaciones metodológicas.

La orina fue filtrada en forma estéril con filtros Milipore (0.22 μm .), acoplados a un sistema de vacío (bomba de vacío GASTDAA-V174-ED), descartando las muestras sobre-diluidas (creatinina < 0.5 gr/lt). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento del análisis.

La orina tratada fue incubada con β -glucuronidasa (SIGMA, St. Louis, MO, U.S.A) durante 12 y 14 horas a 37°C , para permitir la desconjugación del complejo hidroxipireno-glucoronido. Como estándar se utilizó 1-OH-pireno (Accustandard, Inc., New Haven, CT, U.S.A), con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Las muestras y el estándar fueron separados por afinidad en columnas de extracción de fase sólida LiChrolut RP-18 (Merck) y luego eluido con 30 ml de metanol en un sistema de filtración al vacío. Luego, las muestras eluidas fueron secadas con nitrógeno y resuspendidas en 20 μl de acetonitrilo (GREM, grado HPLC).

Para los análisis de cromatografía líquida, se utilizó un equipo Shimadzu C-R4A, con detector UV SPD-2 y detector de fluorescencia Waters modelo 420AC. La columna utilizada fue una LiChrocart 250-4 RP-18 de $5\mu\text{m}$ de diámetro. Se inyectaron 10 μl de muestra en el HPLC con un flujo de 1ml/min.

Los niveles de 1-OH-pireno urinario en los pacientes se expresaron en μmol de 1-OHP/mol creatinina. Los niveles de creatinina se determinaron mediante un kit (*Sigma Diagnostics Creatinine Reagents*), que se basa en el método descrito por Heinegard y Tiderstrom (1973).

La identificación y cuantificación del 1-OHP se realizó por el tiempo de retención (3.25 min.) a una longitud de onda de 235 nm.

- **Determinación de la actividad CYP3A4**

La actividad de CYP3A4 se determinó mediante la cuantificación de los niveles de 6 β -hidroxicortisol en orina (Zhiri y cols., 1987; Zheng y cols., 2001), a través de un kit basado en un ensayo ELISA (*Kit for enzyme immunoassay for urinary 6 β -hydroxycortisol, Stabiligen, Nancy Cédex, France*). La orina utilizada para este análisis fue colectada entre las 8 y las 12 AM (acumulada durante la noche), con el fin de encontrar el metabolito lo más concentrado posible. Las muestras fueron almacenadas en oscuridad a -20°C hasta el momento del análisis. Antes de realizar el ensayo, las muestras fueron centrifugadas y filtradas para eliminar los sedimentos no solubles.

- **Ensayo de inmunocuantificación del antígeno DR-70**

El kit DR 70 (*Diagnostic Kit for Cancer*, AMDL, Tustin CA, USA) se basa en el método de Elisa (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*), permitiendo la inmunodetección del marcador tumoral DR70 a partir de 10 µl de suero, obtenido de sangre periférica (figura 14). Las placas recubiertas con los anticuerpos policlonales de conejos anti-DR70, retienen los antígenos DR70 del suero analizado. Después de un primer lavado se adicionan a la mezcla anticuerpos DR70 conjugados a peroxidasa de rábano. Si el antígeno DR70 está presente, el complejo anti-DR70-peroxidasa se unirá al marcador de tumor inmovilizado, formando un "sandwich". Después de un segundo lavado se agrega el sustrato de la enzima 3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina (TMB). Finalmente se detiene la reacción con HCl 0.1N, y se lee los resultados a 450 nm. La intensidad del color en el plato es proporcional a la cantidad del antígeno DR 70 presente en el suero del paciente.

RESULTADOS

BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN Y RIESGO PARA VOLUNTARIOS EXPUESTOS Y NO EXPUESTOS A EMISIONES DIESEL

- **Polimorfismos genéticos en CYP1A1 (Msp1) y Glutación transferasa M1 (GSTM1) en individuos expuestos a emisiones diesel y voluntarios no expuestos**

Los polimorfismos Msp1 y GSTM1 fueron estudiados en personas expuestas a emisiones diesel, que residen y trabajan en Santiago y en voluntarios no expuestos que viven y laboran en Curacaví. En Santiago se analizaron 87 casos de los cuales, un 25% corresponde a "expuestos urbanos" (personas que trabajan como vendedores ambulantes en la Avda. Independencia, la cual tiene un importante flujo vehicular durante gran parte del día. El 75% restante corresponde a trabajadores de las distintas plantas de revisión técnica de buses y camiones con motores diesel. En Curacaví se analizaron 48 casos de voluntarios que se desempeñan en actividades no relacionadas con exposición a emisiones diesel, por lo que se les denomina voluntarios no expuestos.

La tabla 4 muestra la frecuencia de los genotipos en el polimorfismo Msp1 del gen CYP1A1 en los grupos expuestos y no expuestos a emisiones diesel. Las frecuencias del alelo m2 de los grupos de expuestos y no expuestos a

emisiones diesel fueron 0.42 y 0.53, respectivamente. La diferencia en la frecuencias de m2 para ambos grupos no es estadísticamente significativa (p-value = 0.2938, I.C.95%= -0.081-0.301).

Tabla 4: Distribución genotípica del polimorfismo Msp1 en el gen CYP1A1 en voluntarios expuestos y no expuestos a emisiones diesel

No expuestos		Expuestos	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
m1m1:	9 (18.7%)	m1m1:	23 (26.4%)
m1m2:	27 (56.2%)	m1m2:	55 (63.2%)
m2m2:	12 (25.0%)	m2m2:	9 (10.3%)
Total	48	Total	87
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
m1: 0.47		m1: 0.58	
m2: 0.53		m2: 0.42	

La tabla 5 muestra la frecuencia de la delección del gen GSTM1 en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. Las frecuencias fueron 0.38 para Santiago y 0.33 para Curacaví (p-value = 0.4386, I.C.95%= -0.233-0.133).

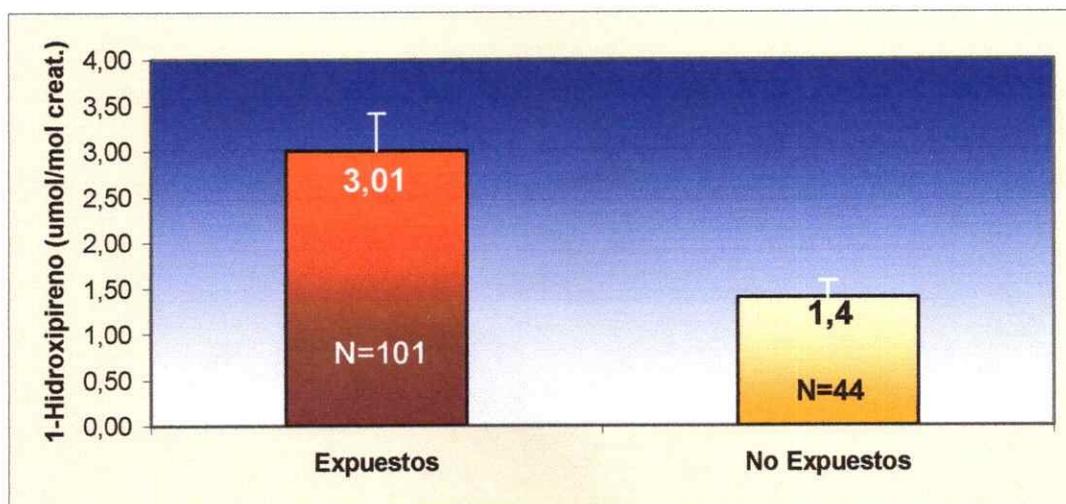
Tabla 5: Frecuencia de la delección en el gen GSTM1 en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel

No expuestos		Expuestos	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
GSTM1 +:	32 (66.6%)	GSTM1 +:	55 (62.5%)
GSTM1 -:	16 (33.3%)	GSTM1 -:	33 (37.5%)
Total	48	Total	88
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
+ : 0.67		+ : 0.62	
- : 0.33		- : 0.38	

- **Niveles de 1-hidroxi pireno urinario como indicador de exposición laboral a hidrocarburos aromáticos policíclicos**

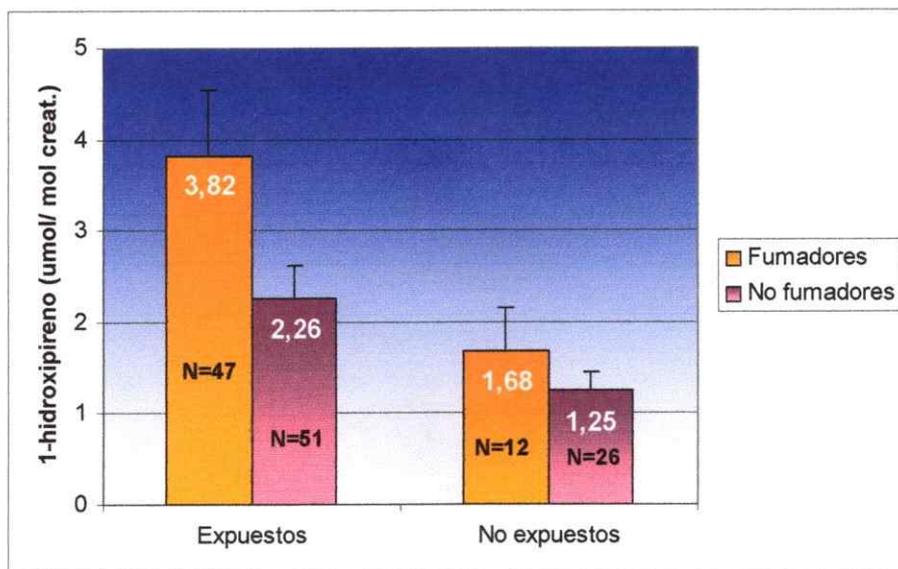
La figura 15 muestra los niveles de 1-OHP urinario en los grupos estudiados. Estos niveles resultaron ser significativamente mayores ($P=0.005$, I.C.= -2.46 - -0.76) en individuos expuestos a emisiones diesel que en voluntarios no expuestos (3.01 y 1.4 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina, respectivamente).

Figura 15: Niveles promedio de 1-hidroxi pireno urinario en trabajadores expuestos a emisiones diesel y en voluntarios no expuestos



Al estratificar por hábito de fumar (figura 16) se observaron diferencias significativas entre grupos de fumadores y no fumadores, tanto en expuestos a emisiones diesel como en controles. Los expuestos fumadores presentaron niveles de 1-OHP urinario significativamente mayores que los no fumadores (3.82 vs. 2.26; p -value=0.005). En el caso de los controles, la diferencia entre los niveles urinarios de 1-OHP (1.68 para fumadores y 1.25 para no fumadores) también fue significativa (p -value=0.0005).

Figura 16: Niveles de 1-OHP urinario en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel, estratificados por hábito de fumar



La figura 16 también muestra que los niveles de 1-OHP en trabajadores no fumadores de las plantas de revisión técnica fueron significativamente mayores ($P=0.0005$; $IC= -1.941 - -0.058$) que en voluntarios no expuestos y no fumadores (2.25 y 1.25 $\mu\text{mol/mol}$ creatinina, respectivamente). En la misma tabla se observa que fumadores expuestos a emisiones diesel mostraron niveles de 1-OHP significativamente mayores ($P= 0.0005$; $IC= -4.126 - -0.153$) que los individuos fumadores no expuestos (3.82 y 1.68 $\mu\text{mol/mol}$ creatinina, respectivamente).

- **Influencia de la actividad CYP3A4 sobre los niveles de 1-OHP urinario.**

La tabla 6 muestra la actividad CYP3A4 expresada como niveles promedio de 6- β hidroxicortisol/ml de orina en los grupos expuestos y no expuestos a emisiones diesel.

Tabla 6: Niveles promedio de 6- β hidroxicortisol/ml en orina de individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel

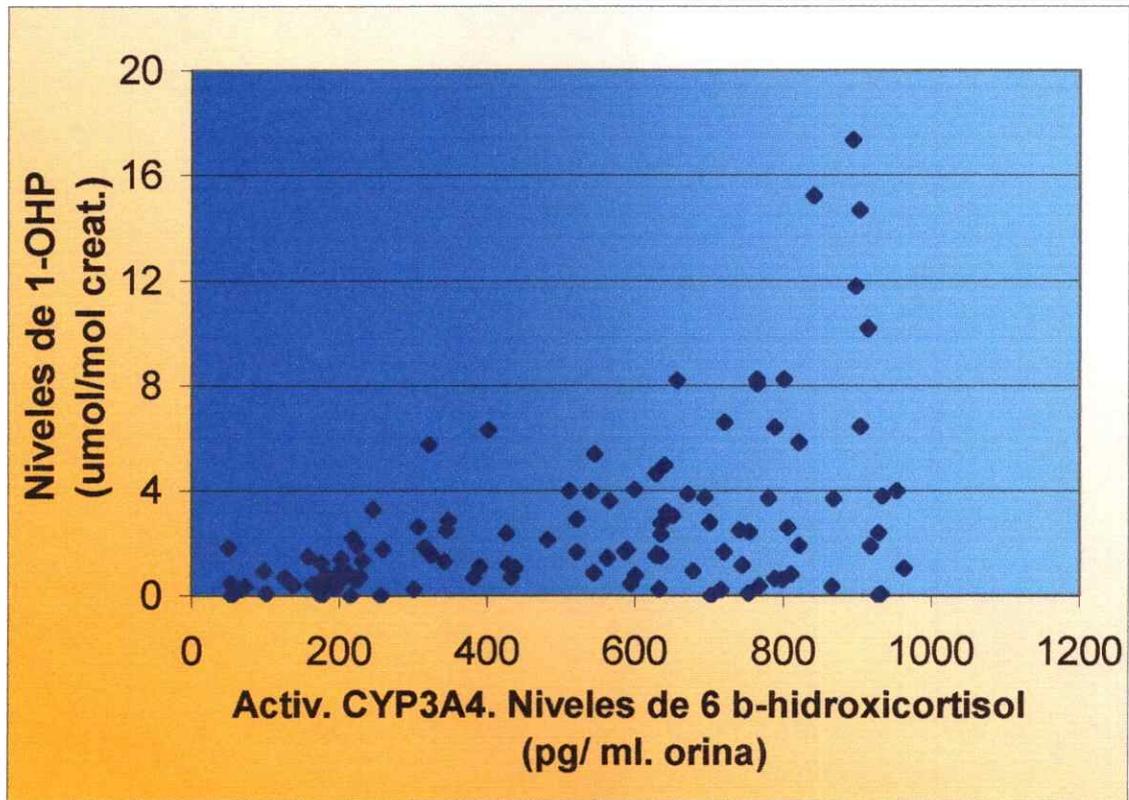
Grupo	N	Promedio (pgrs) \pm Desviación estándar
Diesel 1	21	629.3 \pm 244.3
Diesel 2	27	492.9 \pm 275.1
Diesel 3	20	551.2 \pm 300.3
Urbanos	19	371.3 \pm 189.5
Total expuestos	88	507.8 \pm 266.9
Curacaví	47	524.5 \pm 298.7

La diferencia entre los promedios de actividad CYP3A4 de los grupos no expuestos y expuestos no fue significativa ($p= 0.369$, I.C. = -81.87 – 115.27), incluso si se consideran sub-grupos de la población expuesta, como el caso de la planta Diesel 1, que presenta el promedio más alto de actividad CYP3A4.

La figura 17 muestra el análisis gráfico de la correlación entre los niveles de actividad CYP3A4 y la concentración urinaria de 1-OHP. Se observa una tendencia de correlación positiva ($r=0.46$) en niveles de actividad bajos y

medios de CYP3A4, pero a medida que aumenta la actividad CYP3A4, se incrementa la dispersión de los valores de 1-OHP.

Figura 17: Correlación entre niveles de 1-OHP urinario y actividad CYP3A4 en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel



Al considerar una relación lineal de los datos, se obtiene un valor de correlación cercana al 38%, pero a pesar de lo baja de la relación lineal, el modelo utilizado es altamente significativo ($F(1;119) = 20.16$, $p = 0.0005$). La relación mejora considerablemente si se toman los logaritmos naturales tanto de la

concentración urinaria de 1-OHP como de la actividad CYP3A4. Al tomar en cuenta valores de CYP3A4 menores a 600 pg de 6-β-hidroxicortisol/ml de orina, la correlación se eleva a un 61 % (calidad del modelo: $F(1;63) = 37.47$, $p = 0.0005$)

Cabe destacar que la influencia de CYP3A4 resultó ser altamente significativa en ambos casos (considerando una relación lineal o una logarítmica), tal como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7: Influencia de la actividad de CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel

	N	valor T	P> t	I.C. (95%)	Grado de correlación (R)
Niveles 1-OHP Vs. activ. CYP3A4	145	3.786	0.000	0.005 - 0.017	0.4614
Ln (nivel 1-OHP) Vs. Ln (activ.CYP3A4)	145	5.242	0.000	0.790 -1.772	0.5955

El análisis se realizó considerando niveles de actividad CYP3A4 menores a 500 pg de 6-β-hidroxicortisol /ml. orina.

La tabla 8 muestra la influencia de la actividad CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario al estratificar por hábito de fumar y por exposición. Al estratificar

por exposición a emisiones diesel, la actividad CYP3A4 mostró una relación significativa en los niveles de 1-OHP urinario en trabajadores de plantas de revisión técnica y en expuestos urbanos ($p < 0.0005$, I.C.=0.005 – 0.110). En cambio en los voluntarios no expuestos, la relación no fue significativa ($p = 0.533$, I.C.=-0.004 – 0.007). Al estratificar el grupo de expuestos por su hábito de fumar, se observa que tanto los expuestos fumadores como los no fumadores exhiben valores significativos en la relación de CYP3A4 con los niveles urinarios de 1-hidroxipireno. Para el caso de los individuos no expuestos, la actividad CYP3A4 deja de ser significativa en los fumadores ($p = 0.559$, I.C.=-4.49 – 2.82), mientras que sigue siendo levemente significativa ($p = 0.04$, I.C.= 0.03 – 1.22) en los no fumadores, como lo indica la tabla 8.

Tabla 8: Influencia de la actividad CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario de individuos estratificados por exposición y hábito de fumar

Actividad de 3A4 en grupos de:	Valor t	P> t	I.C. (95%)
Expuestos	5.793	0.000	0.005 - 0.011
No expuestos	0.629	0.533	-0.004 - 0.007
Expuestos fumadores	4.975	0.000	0.606 - 1.437
Expuestos no fumadores	5.014	0.000	0.735 - 1.730
No expuestos fumadores	-0.637	0.559	-4.499 - 2.821
No expuestos no fumadores	2.157	0.040	0.031 - 1.223

La tabla 9 muestra que la influencia de la actividad CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario al estratificar por sexo y exposición intradomiciliaria. Se observa que en los hombres existe una correlación significativa entre la actividad de CYP3A4 y la concentración de 1-OHP urinario ($p < 0.0005$, I.C. = 0.70 – 1.32). En cambio, en las mujeres se pierde la correlación ($p = 0.182$, I.C. = -0.27 – 1.36). En la tabla 9 se muestra también la influencia de la contaminación intradomiciliaria, definida como la exposición a sistemas de calefacción que funcionan con combustibles como: leña, carbón o parafina. Se observa que la actividad de CYP3A4 no influye en los niveles de 1-OHP urinario, ya que ésta es significativa tanto en los individuos expuestos y no expuestos a este tipo de emisiones.

Tabla 9: Influencia de la actividad CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario al estratificar por sexo y por exposición a emisiones intradomiciliarias

Actividad de 3A4 en grupos de:	Valor t	P> t	I.C. (95%)
Hombres	6.398	0.000	0.698 - 1.326
Mujeres	1.387	0.182	-0.278 - 1.368
Personas con exposición domiciliaria	3.888	0.000	0.407 - 1.282
Personas sin exposición domiciliaria	4.239	0.000	0.507 - 1.413

- **Influencia actividad CYP3A4 y polimorfismos Msp1 y GSTM1 en los niveles de 1-OH-pireno urinario**

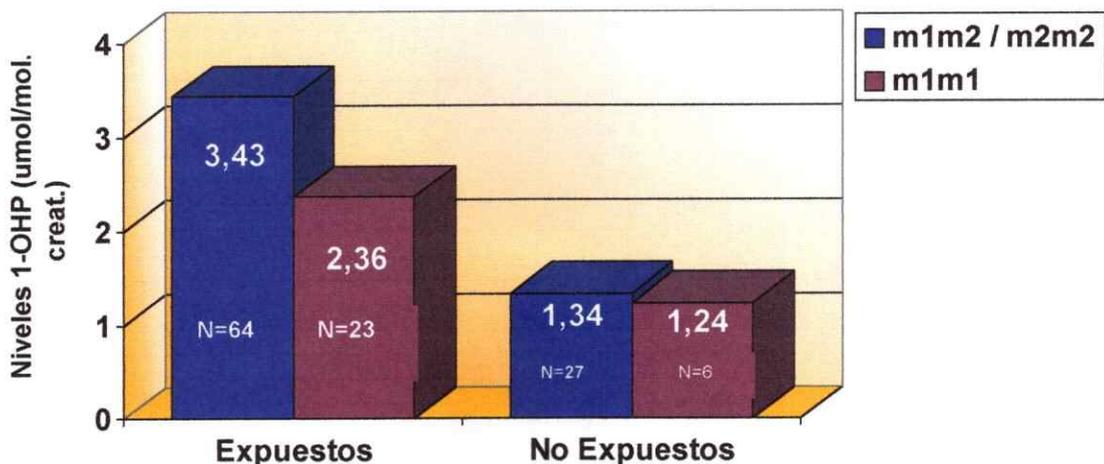
La influencia del polimorfismo Msp1 de CYP1A1 y de la delección de GSTM1 en los niveles de 1-OHP urinario de individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel se muestra en la tabla 10. La condición heterocigota de CYP1A1, m1m2, presenta, por si sola, una asociación estadísticamente significativa ($p = 0.036$, I.C.95%= 0.11-3.12) con la variación en los niveles de 1-OH-pireno urinario en las personas expuestas laboralmente a emisiones de motores diesel. En cambio, la delección de GSTM1 no muestra efectos significativos sobre los niveles de 1-OHP, aún cuando se le asocie con otro biomarcador.

Tabla 10: Relación entre polimorfismos Msp1 y GSTM1 en niveles urinarios de 1-OHP en sujetos expuestos a emisiones diesel

<i>Genotipo</i>	<i>t value</i>	<i>P> t </i>	<i>I.C. (95%)</i>
<i>m1m2</i>	2.131	0.036	0.111 – 3.122
<i>m2m2</i>	-0.953	0.342	-2.994 – 1.049
<i>GSTM1</i>	-0.168	0.867	-1.538 – 1.298

Al examinar los niveles promedio de 1-OHP en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel, se observa que los individuos expuestos a emisiones diesel y portadores del alelo m2 muestran niveles significativamente mayores ($p=0.005$, I.C.=-2.74-0.60), tal como se muestra en la figura 18. En el caso de GSTM1, no se observaron asociaciones significativas entre la delección del gen y los niveles de 1-OHP urinario. En individuos expuestos, el nivel promedio fue de 3.11 y 3.14 en personas con genotipo GSTM1+ y GSTM1-, respectivamente.

Figura 18: Niveles promedio de 1-OHP en individuos expuestos y no expuestos a emisiones diesel estratificados por genotipo Msp1



La tabla 11 muestra la influencia de la actividad CYP3A4 y CYP1A1 sobre los niveles urinarios de 1-OHP de individuos expuestos y no expuesto a emisiones diesel. La actividad de CYP3A4 ejerce una mayor influencia sobre los niveles de 1-OHP urinario en individuos portadores del alelo polimórfico m2. En el caso de los individuos homocigotos para la mutación Msp1, el valor del coeficiente de correlación (r) entre el logaritmo de la actividad de CYP3A4 y el logaritmo de los niveles de 1-hidroxipireno es de 0.737.

Tabla 11: Influencia de CYP3A4 sobre los niveles de 1-OHP según la condición genética para Msp1

Actividad de 3A4 en grupo:	Valor t	P> t	I.C. (95%)
m1m1	2.785	0.010	0.243 - 1.614
m1m2	3.945	0.000	0.395 - 1.204
m2m2	4.224	0.001	0.579 - 1.760

POLIMORFISMOS GENETICOS Msp1 Y GSTM1 EN PACIENTES CON CANCER PULMONAR E INDIVIDUOS SANOS DE LA II REGION

- **Características de la población**

La población estudiada correspondió a pacientes con cáncer pulmonar (con o sin tratamiento) del Hospital Regional de Antofagasta, provenientes de diferentes zonas de la II región, y a voluntarios sanos sin enfermedades respiratorias (controles), que declaran vivir en la segunda región por al menos 10 años. Para los análisis de polimorfismos genéticos se analizaron 57 casos de cáncer pulmonar y 103 individuos sanos (controles).

La tabla 12 muestra algunas características tales como: edad, sexo y hábito de fumar para los grupos estudiados. El 70% de los casos de cáncer pulmonar correspondió a hombres y el 30% a mujeres, mientras que para los controles, el 54% era de sexo masculino y el 46% femenino. El porcentaje de fumadores fue de 59.6% para los casos de cáncer y de 48,5% para controles. La edad promedio era de 63.2 años en los casos de cáncer y de 53.3 en los controles.

Tabla 12: Características generales de los grupos estudiados

PARAMETRO	CONTROLES	CANCER PULMONAR
	N = 103	N = 57
Edad (años) \pm D.S	53.3 \pm 13.7	63.2 \pm 13.4
Sexo (M/F)	56/47	40/17
Hábito de fumar (% fumadores)	50 (48.5 %)	34 (59.6 %)

*M: masculino

F: femenino

- **Polimorfismo Msp1 en la II Región**

La tabla 13 muestra la distribución y frecuencia alélica para el polimorfismo Msp1 del gen CYP1A1 en pacientes con cáncer pulmonar y en controles sanos de la ciudad de Antofagasta. La frecuencia del alelo mutado m2 fue de 0.46 y 0.41 en los grupos de cáncer y controles, respectivamente. La diferencia entre estas frecuencias no es estadísticamente significativa ($p= 0.4371$, I.C.= -0.224-0.124), sin embargo, el alelo m2 es 1.29 veces más frecuente en los pacientes con cáncer pulmonar que en los controles. Al realizar el análisis de riesgo, basado en el cálculo de la *Odds Ratio* (O.R.), se encontró que los individuos portadores de los genotipos m1m2 ó m2m2 presentan un riesgo

significativamente mayor de cáncer pulmonar (O.R.= 2.08, I.C.95%=1.04-4.03, p-value = 0.04) que las personas con genotipo “normal” (m1m1).

Tabla 13: Frecuencia del polimorfismo Msp1 en controles sanos y en pacientes con cáncer pulmonar de Antofagasta.

CONTROLES		CANCER	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
m1m1:	44 (42.7%)	m1m1:	15 (26.3%)
m1m2:	33 (32.0%)	m1m2:	31 (54.3%)
m2m2:	26 (25.2%)	m2m2:	11 (19.3%)
Total	103	Total	57
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
m1: 0.59		m1: 0.54	
m2: 0.41		m2: 0.46	
Odds Ratio			
m1m2+m2m2/ m1m1: O.R.= 2.08, I.C.= 1.04–4.03 p-value: 0.04			

Por otra parte, al estratificar por hábito de fumar (tabla 14), se observa que en fumadores, el alelo m2 se asocia a la incidencia de cáncer pulmonar. En el caso de individuos fumadores, la diferencia de las frecuencias entre los grupos cáncer y control no fueron significativas (p-value = 0.2532, I.C.95%=-0.338-0.138). Para los controles fumadores la frecuencia de m2 fue 0.36 y para los pacientes con cáncer fumadores fue 0.46 (la frecuencia del alelo mutado fue 1.36 veces mayor en el grupo de fumadores con cáncer pulmonar). El riesgo para estos pacientes, asociado a la presencia de m2 fue de 2.3 veces, pero no alcanzó a ser estadísticamente significativo (I.C.= 0.95–5.26, p-value: 0.0736).

Tabla 14: Frecuencia para el polimorfismo Msp1 en controles sanos y pacientes fumadores con cáncer de la II Región

CONTROLES FUMADORES		CANCER FUMADOR	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
m1m1:	24 (48.0%)	m1m1:	10 (29.4%)
m1m2:	16 (32.0%)	m1m2:	17 (50.0%)
m2m2:	10 (20.0%)	m2m2:	7 (20.6%)
Total	50	Total	34
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
m1: 0.64		m1: 0.54	
m2: 0.36		m2: 0.46	

Odds Ratio

m1m2+m2m2/ m1m1: O.R.= 2.30, I.C.= 0.95–5.26 p-value: 0.0736

En individuos no fumadores (tabla 15), no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas. Para el alelo mutado se obtuvo una frecuencia de 0.45 en pacientes con cáncer y 0.46 en controles, con un p-value = 0.8562 (I.C.95% = -0.274-0.294). El análisis de riesgo tampoco resultó ser significativo, a pesar de que la O.R alcanzó un valor de 1.93 (I.C.= 0.70 – 4.76, p-value = 0.2576).

Tabla 15: Frecuencia del polimorfismo Msp1 en pacientes con cáncer pulmonar y controles no fumadores de Antofagasta

CONTROLES NO FUMADOR		CANCER NO FUMADOR	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
m1m1:	20 (36.5%)	m1m1:	5 (21.7%)
m1m2:	17 (32.6%)	m1m2:	14 (65.2%)
m2m2:	16 (30.7%)	m2m2:	2 (13.0%)
Total	53	Total	21
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
m1: 0.54		m1: 0.55	
m2: 0.46		m2: 0.45	

Odds Ratio

m1m2+m2m2/ m1m1: O.R.= 1.93, I.C.= 0.70 – 4.76 p-value: 0.2576

Las tablas 16 y 17 muestran la distribución de genotipos y la frecuencia para el polimorfismo Msp1 en controles sanos y pacientes con cáncer pulmonar, estratificados por sexo. En el caso de los hombres (tabla 16), el riesgo asociado a la presencia del alelo m2 tuvo un valor altamente significativo (O.R.= 2.60, I.C.=1.07-5.94, p-value = 0.0334). Para las mujeres (tabla 17), no se encontraron valores significativos. La diferencia de las frecuencias del alelo mutado no fue significativa en el grupo de hombres ni en el de mujeres.

Tabla 16: Distribución genotípica del polimorfismo Msp1 en hombres sanos y casos con cáncer pulmonar de Antofagasta

CONTROLES HOMBRES		CANCER HOMBRES	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
m1m1:	26 (46.4%)	m1m1:	10 (25.0%)
m1m2:	16 (28.6%)	m1m2:	23 (57.5%)
m2m2:	14 (25.0%)	m2m2:	7 (17.5%)
Total	56	Total	40
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
m1: 0.61		m1: 0.54	
m2: 0.39		m2: 0.46	
Odds Ratio			
m1m2+m2m2/m1m1: O.R.= 2.60, I.C.= 1.07 – 5.94 p-value: 0.0334			

Tabla 17: Distribución genotípica del polimorfismo Msp1 en mujeres sanas y casos con cáncer pulmonar de Antofagasta

CONTROLES MUJERES		CANCER MUJERES	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
m1m1:	18 (38.3%)	m1m1:	5 (29.4%)
m1m2:	17 (36.2%)	m1m2:	8 (47.0%)
m2m2:	12 (25.5%)	m2m2:	4 (23.5%)
Total	47	Total	17
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
m1: 0.56		m1: 0.53	
m2: 0.44		m2: 0.47	
Odds Ratio			
m1m2+m2m2/m1m1: O.R.= 1.49, I.C.= 0.49 – 4.10 p-value: 0.5161			

- **Deleción en el gen de la glutatión-S-transferasa M1 (GSTM1)**

Los datos para la frecuencia de la deleción del gen de GSTM1 en Antofagasta se muestran en la tabla 18. No se observaron diferencias significativas en las frecuencias de los grupos control y con cáncer pulmonar (GSTM1 "nulo" = 0.39 en pacientes con cáncer pulmonar y 0.35 en controles sanos, p-value = 0.5020, I.C.95%= -0.210-0.130). El valor de la O.R. (1.17) tampoco resultó ser significativo (I.C. = 0.59-2.30, p-value = 0.6470).

Tabla 18: Frecuencia del polimorfismo GSTM1 en controles sanos y en pacientes con cáncer pulmonar de Antofagasta.

CONTROLES		CANCER	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
GSTM1 +:	67 (65.0%)	GSTM1 +:	35 (61.4%)
GSTM1 -:	36 (35.0%)	GSTM1 -:	22 (38.5%)
Total	103	Total	57
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
+ : 0.65		+ : 0.61	
- : 0.35		- : 0.39	
Odds Ratio			
GSTM1 "nulo": O.R. = 1.17, I.C. = 0.59-2.30 p-value = 0.6470			

Al estratificar por hábito de fumar, se observa que tanto los fumadores (tabla 19) como los no fumadores (tabla 20), no mostraron diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias como tampoco en los valores

de O.R al comparar el genotipo “nulo” (GSTM1 -) con el alelo silvestre (GSTM1 +).

Tabla 19: Frecuencia del polimorfismo GSTM1 en pacientes con cáncer pulmonar y controles sanos fumadores de Antofagasta.

CONTROLES FUMADORES		CANCER FUMADORES	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
GSTM1 +:	34 (68%)	GSTM1 +:	21 (61.7%)
GSTM1 -:	16 (32%)	GSTM1 -:	13 (38.2%)
Total	50	Total	34
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
+ : 0.68		+ : 0.62	
- : 0.32		- : 0.38	

Odds Ratio

GSTM1 “nulo”: O.R.=1.31, I.C. = 0.57-3.01 p-value = 0.5575

Tabla 20: Frecuencia del polimorfismo GSTM1 en controles y pacientes con cáncer pulmonar no fumadores de Antofagasta.

CONTROLES NO FUMADORES		CANCER NO FUMADORES	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
GSTM1 +:	33 (62.2%)	GSTM1 +:	12 (57.1%)
GSTM1 -:	20 (37.7%)	GSTM1 -:	9 (42.8%)
Total	53	Total	21
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
+ : 0.62		+ : 0.57	
- : 0.38		- : 0.43	

Odds Ratio

GSTM1 “nulo”: O.R.= 1.23, I.C. = 0.47 – 3.27 p-value = 0.6861

Al estratificar por sexo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos cáncer y control. En los pacientes hombres con cáncer pulmonar, no se encontró un riesgo asociado al genotipo nulo (tabla 21). En las mujeres con cáncer, el riesgo asociado al gen nulo fue de 1.83 veces, aún cuando no fue estadísticamente significativo (tabla 22).

Tabla 21: Frecuencia de la delección GSTM1 en hombres controles y con cáncer pulmonar de Antofagasta

CONTROLES HOMBRES		CANCER HOMBRES	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
GSTM1 +:	33 (59.0%)	GSTM1 +:	25 (62.5%)
GSTM1 -:	23 (41.0%)	GSTM1 -:	15 (37.5%)
Total	56	Total	40
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
+ : 0.59		+ : 0.52	
- : 0.41		- : 0.38	

Odds Ratio

GSTM1 "nulo": O.R.= 0.86, I.C. = 0.39 – 1.89 p-value = 0.7256

Tabla 22: Frecuencia de la delección GSTM1 en mujeres controles y con cáncer pulmonar de Antofagasta

CONTROLES MUJERES		CANCER MUJERES	
Genotipo	N (%)	Genotipo	N (%)
GSTM1 +:	34 (68.4%)	GSTM1 +:	10 (58.8%)
GSTM1 -:	13 (31.6%)	GSTM1 -:	7 (41.2%)
Total	47	Total	17
Frecuencia alélica:		Frecuencia alélica:	
+ : 0.72		+ : 0.59	
- : 0.32		- : 0.41	

Odds Ratio

GSTM1 “nulo”: O.R.= 1.83, I.C. = 0.84–5.15 p-value = 0.3036

- **Análisis de riesgo combinado m2/GSTM1 “nulo”**

Se realizó también un análisis de riesgo combinado, basado en el cálculo de la O.R. considerando la presencia tanto del alelo mutado m2 en CYP1A1 como de la delección de GSTM1 (“nulo”). En este análisis, el riesgo en la población total aumentó significativamente (O.R.=2.51, I.C.95%=1.07-5.40, p-value = 0.0322) con respecto al análisis hecho considerando sólo un polimorfismo a la vez (tabla 23). Cuando se estratificó por hábito de fumar, se encontró también un aumento en la O.R. (2.98) que resultó ser estadísticamente significativo (I.C.95%= 1.10-7.10, p-value = 0.0497).

Tabla 23: Análisis de riesgo combinado m2/GSTM1 “nulo” para pacientes con cáncer pulmonar e individuos sanos de Antofagasta

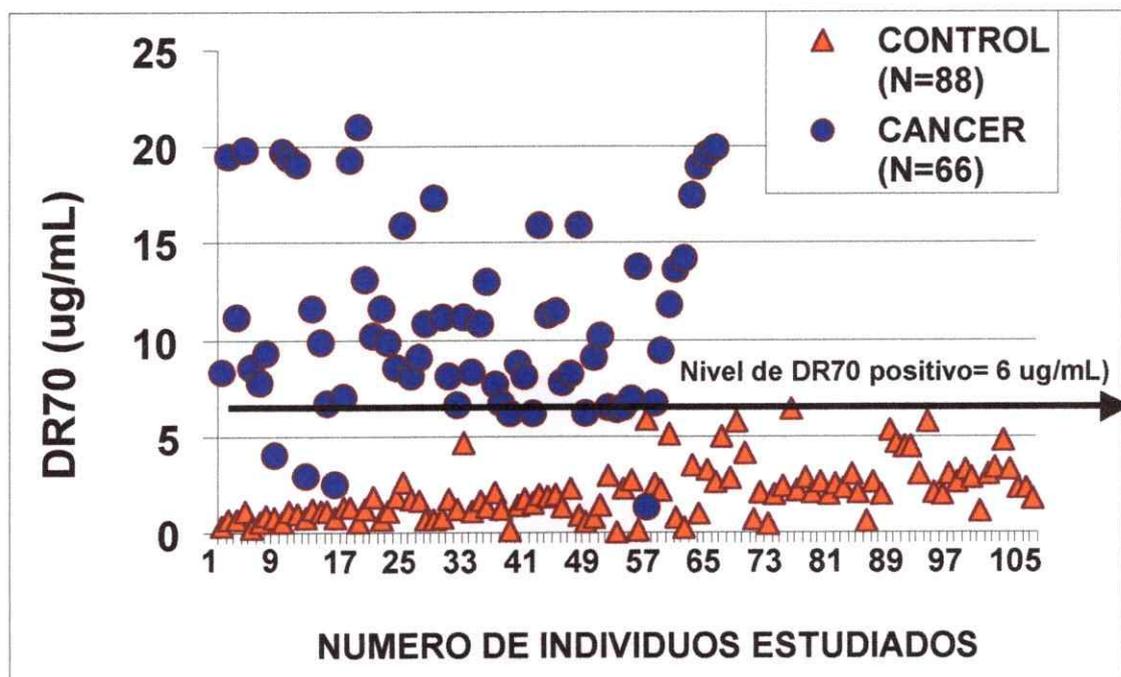
Grupo	O.R.	I.C. (95%)	p-value
Población total	2.51	1.07-5.40	0.0322
Fumadores	2.98	1.10-7.10	0.0497

- **Niveles del antígeno DR-70 en individuos sanos y con cáncer pulmonar de Antofagasta**

Para analizar los niveles del antígeno DR-70, se consideraron como individuos controles a personas que no presentaban ninguna enfermedad respiratoria (N = 88) y como cáncer (CA) a los casos confirmados, tanto de pacientes que no han recibido ningún tipo de tratamiento (N=66) como los que si lo han recibido (N=19), como por ejemplo: cirugía, quimioterapia, radioterapia, etc. También se analizaron los niveles de DR-70 en individuos que presentaban otras patologías respiratorias, para evaluar la aparición de falsos positivos.

Los niveles de DR-70 resultaron ser significativamente mayores ($p < 0.05$) en los casos de cáncer pulmonar (sin tratamiento) que en los individuos sanos (figura 19).

Figura 19: Niveles del antígeno tumoral DR-70 en pacientes con cáncer pulmonar y controles de Antofagasta



El valor de 6 μg de antígeno DR-70 / mL. de suero fue considerado como nivel umbral para respuesta positiva. Los pacientes con cáncer pulmonar mostraron por lo general niveles de DR-70 iguales o mayores a 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Bajo estas condiciones, el ensayo de DR-70 mostró una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 99%.

En general, los tratamientos clínicos para cáncer como: quimioterapia, radioterapia, lobectomía, etc., resultaron ser efectivos en la disminución del antígeno. Para estos caso, los niveles de DR-70 fueron menores a $6\mu\text{g/ml}$.

Por otro lado, diversas enfermedades respiratorias, como bronquiectasia y pleuritis granulomatosa originaron algunos casos de falsos positivos. Neumonía, bronquitis crónica y asma no provocan aumento en los niveles de DR-70. Por lo general, los tumores benignos no provocaron falsos positivos (tabla 24).

Tabla 24: Niveles del Antígeno DR-70 en individuos controles, con cáncer pulmonar (con y sin tratamiento) y con otras patologías respiratorias de Antofagasta

Población Estudiada	Promedio	Desviación Estándar	Mínimo	Máximo
Control (N=88)	1.77	1.32	0.01	6.38
Cáncer Pulmonar sin Tratamiento (N= 66)	10.41	4.63	1.29	20.96
Cáncer Pulmonar Tratado (N= 19)	1.74	1.48	0.48	5.26
*Otras Enfermedades Respiratorias (N= 13)	4.20	4.62	0.89	12.63
Tumores Benignos (N=8)	2.58	2.26	0.91	6.54
**Otros Cánceres (N = 2)	1.65	-	1.21	2.08

* Otras enfermedades respiratorias incluyen: Bronquiectasia, neumonías, pleuritis granulomatosa, TBC

** CA de esófago

DISCUSIÓN

La contaminación del aire es uno de los problemas de salud más preocupantes que enfrenta la ciudad de Santiago, el cual tiene incidencia tanto en el ámbito social como en el político. A pesar de los considerables esfuerzos que se han realizado desde hace ya bastante tiempo, y de algunos avances importantes en la reducción de emisiones, aún se está muy lejos de una solución, debido principalmente a la complejidad del problema y a su amplia gama de efectos sobre la población.

Las autoridades, como es lógico pensar, ponen mayor énfasis en la prevención y tratamiento de los efectos agudos e inmediatos de los contaminantes ambientales, pero esta política está dejando de lado los efectos a largo plazo, como el cáncer. Por ejemplo, el cáncer pulmonar, asociado al hábito de fumar y, posiblemente, a componentes tóxicos presentes en el aire de Santiago, es producto de eventos que pueden haber tenido lugar hace 20 o 40 años atrás. Por esto, es necesario generar nuevo conocimiento aplicable a nuestra realidad para entender las bases moleculares de la acción de estos compuestos y posteriormente, poner a disposición del trabajo clínico todos los antecedentes que permitan evaluar el riesgo o predisposición de un individuo a este tipo de enfermedades.

En el presente estudio se han evaluado los efectos del estilo de vida (como el hábito de fumar), la contaminación intradomiciliaria, los polimorfismos

genéticos (Msp1 en el gen de CYP1A1, la delección del gen de GSTM1), y la incidencia de la actividad CYP3A4 en los niveles de 1-OHP urinario en individuos no expuestos a emisiones diesel residentes en un área rural (Curacaví) y en individuos expuestos a este tipo de emisiones residentes en Santiago.

Estudios previos de este laboratorio muestran que el material particulado respirable de la ciudad de Santiago, tanto MP₁₀ como MP_{2.5}, contiene diversos HAPs cancerígenos, que son altamente mutagénicos en bacterias y células humanas (Gil y Adonis, 1996; Adonis y Gil, 2000). Por muchos años se ha discutido si la presencia de cancerígenos en el material particulado respirable tiene relación con el incremento de cáncer pulmonar. Aunque varios trabajos habían ya demostrado esta relación (Pope y cols., 2002), los resultados habían sido considerados como “no concluyentes”, principalmente debido a la imposibilidad de eliminar factores distractores y porque el número de personas estudiadas no permitía obtener una estadística altamente significativa. Esto parece resuelto en un estudio reciente efectuado por Pope y cols. (2002), en el que se demostró que la exposición prolongada a material particulado fino (MP_{2.5}) se asocia significativamente con un incremento en la mortalidad general y, específicamente, con muertes asociadas a cáncer pulmonar y enfermedades cardiopulmonares. Los autores señalan que un incremento de 10 µg/m³ en el promedio de concentraciones ambientales de

MP_{2.5}, se asocia con 4%, 6% y 8% de aumento en la mortalidad por causas generales, por enfermedades cardiopulmonares y por cáncer pulmonar, respectivamente. En este estudio se analizaron 500.000 adultos, durante un período de 16 años (1982-1998) en 116 ciudades de los Estados Unidos, por lo que los valores estadísticos son, sin ninguna duda, altamente significativos.

En esta investigación, el promedio de concentración para MP_{2.5}, obtenido entre los años 1979 y 1998, en 51 ciudades de EE.UU. fue de $17.7 \pm 3.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Al inicio del estudio (1982), las ciudades más contaminadas tenían $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{2.5} más que las menos contaminadas, lo que representaba un riesgo 16% mayor de morir por cáncer pulmonar. En 1998, el exceso era de $12 \mu\text{g}/\text{m}^3$ que corresponde a un 9.6% más de riesgo (Pope y cols. 2002).

Este artículo es muy importante ya que la Corte Suprema de EE.UU. debe ratificar la posición de la EPA sobre la norma de MP_{2.5}, fijada en $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ como promedio anual. En EE.UU., durante los años 1979-1983, el promedio de MP_{2.5} fue de $21 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y en el período 1999-2000 disminuyó a $14 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Esta es considerada la mejor evidencia de que la exposición a material particulado fino (para el cual no existe norma en Chile) está significativamente asociado a mortalidad por cáncer pulmonar, entre otros.

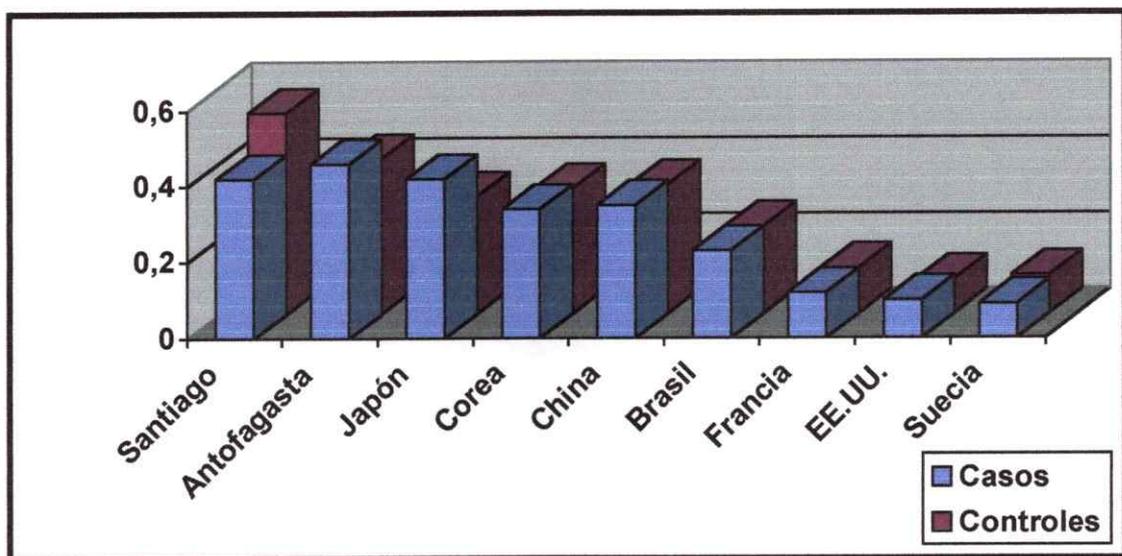
En Santiago, las mediciones efectuadas en el invierno del año 2000 para $MP_{2.5}$ arrojaron un promedio de $99.73 \mu\text{g}/\text{m}^3$ en la zona urbana. En plantas de Revisión Técnica, el promedio fluctuó entre 106.71 y $93.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Estos valores están muy por sobre los valores referidos en el estudio de Pope y cols (2002)., lo que demuestra el gran riesgo al que está expuesta la población chilena con relación a contaminantes ambientales. Por el contrario, en Curacaví (zona control), el promedio obtenido de las mediciones efectuadas en agosto de 2001 fue de $17.67 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Riquelme, 2002)

Los marcadores genéticos han sido ampliamente utilizados para evaluar los efectos de contaminantes genotóxicos ambientales y su relación con enfermedades como el cáncer. Al respecto, el polimorfismo Msp1 en CYP1A1 y la delección de la Glutación S-transferasa M1 (GSTM1 "null") han sido asociados a la aparición de efectos biológicos, como los aductos de ADN y a un incremento del riesgo a desarrollar cáncer pulmonar (Taningher y cols., 1999). Por esto, estudios de este tipo son de suma urgencia en ciudades altamente contaminadas, como Santiago.

Sorprendentemente en este estudio, al investigar la población control, se encontró una alta frecuencia (53%) para el genotipo mutado (m2) de CYP1A1, siendo ésta una de las mayores descritas en la literatura para esta mutación. Las frecuencias obtenidas en Santiago (42%) y en Antofagasta

(46%) también están dentro de las más altas descritas (Figura 20). Esto se podría atribuir a una importante mezcla racial mestiza (indígena-europeo) dado que, como se ha descrito anteriormente (Quiñones, 1999; Muñoz y cols., 1998), existe una fuerte correlación positiva entre el aumento de mezcla indígena y el aumento de la frecuencia de m2, pasando éste incluso a ser el alelo dominante.

Figura 20: Frecuencia de m2 en diferentes poblaciones del mundo



Entre los expuestos a emisiones diesel, el 73.5 % de los individuos analizados portaban al menos una copia del gen mutado y un 10.3 % de las personas eran homocigotas para esta condición. En Curacaví, un 81.2 % portaba una copia del alelo m2 y un 25 % tenía genotipo m2m2.

En cuanto a la delección de GSTM1, los valores no muestran diferencias significativas. En el grupo de expuestos, un 38 % portaba la delección homocigota del gen y en Curacaví, un 33 % respondía a esta condición.

Con respecto al 1-hidroxipireno urinario, éste mostró ser un efectivo biomarcador de exposición a HAPs ambientales, ya que cumple con varias de las características exigidas para un indicador de este tipo. Por ejemplo, un buen biomarcador debe poder ser detectado por una técnica rápida, simple, económica y no invasiva. El 1-OHP puede ser detectado por HPLC (high pressure liquid chromatography), una técnica considerablemente sensible y de no muy alto costo. Puede determinarse en muestras de orina, las que son fácilmente accesibles. Otro factor importante es que resultados de nuestro laboratorio (Riquelme, 2002) señalan que el pireno puede constituir hasta el 65% del total de los HAPs detectados en los lugares estudiados, lo que hace del 1-hidroxipireno un metabolito abundante y de fácil detección. Otros metabolitos de HAPs han sido sugeridos como marcadores de exposición, por ejemplo el 3-OH-Benzo[a]pireno, 2- 3- y 4-monohidroxifenantreno, y 2-naftaleno (Strickland y cols., 1996; Heudorf y Angerer, 2001; Nan y cols., 2001). El 1-OHP toma en cuenta todas las posibles vías de exposición, mientras que otros biomarcadores, como el 2-naftol, son más sensibles en individuos que fuman pero que no están expuestos laboralmente. Además, en nuestro laboratorio se determinó que el pireno está presente en una

cantidad 11 veces mayor que el benzo(a)pireno, lo que valida la utilización del 1-hidroxipireno como biomarcador por sobre otros compuestos.

Los resultados de esta tesis muestran claramente que los niveles de 1-OHP en la orina resultaron ser significativamente mayores en individuos expuestos a emisiones diesel comparados con los individuos no expuestos de Curacaví (3.015 vs. 1.40 μmol 1-OHP/mol de creatinina, respectivamente). Existen dos factores que podrían contribuir a las diferencias observadas en los niveles de 1-OHP urinario. Estas son: a) diferencias en la retención del pireno inhalado y b) la eficacia en la metabolización del pireno hasta 1-OHP. Cabe destacar que principalmente se han establecido relaciones entre los niveles de 1-OHP y CYP1A1. En 1998, Wu y cols. describieron una asociación significativa entre el genotipo m2m2 y altos niveles de 1-hidroxipireno urinario en trabajadores de hornos de carbón, lo que es de esperar, ya que la presencia del alelo m2 ha sido relacionada con una inducción de la enzima CYP1A1, responsable de la biotransformación de HAPs. El CYP1A1 extrahepático es preferentemente expresado en el pulmón, donde interactúa directamente con los HAPs inhalados. Sin embargo, la mayor parte de la metabolización del pireno tiene lugar en el hígado, donde CYP1A1, CYP2E1, CYP2D6 y principalmente CYP3A4 serían de gran importancia. Por lo tanto, el metabolismo de pireno por CYP1A1 podría representar sólo una parte del 1-OHP excretado por la orina y, en consecuencia, la influencia de este

citocromo sería dependiente de la ruta de ingreso de HAPs. Debería presentar una asociación mayor en el ingreso por inhalación o por vía dérmica que en la vía digestiva. Esto explicaría la falta de asociación entre Msp1 y los niveles de 1-OHP urinario reportados en algunos estudios.

Siempre existe un nivel basal de exposición a 1-OHP (o HAPs) en cualquier ambiente. En este caso, la exposición basal se determinó con los niveles obtenidos en individuos no expuestos a emisiones diesel y no fumadores residentes en Curacaví. El valor promedio de 1-OHP en este grupo fue de 1.25 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina. Si bien no se conocen estándares para individuos no expuestos laboralmente y sin hábito de fumar, se ha propuesto un valor de 0.24 $\mu\text{mol 1-OHP/mol}$ de creatinina para poblaciones europeas (Jongeneelen, 2001; Gundel y cols., 1996) Esto quiere decir que los niveles de 1-OHP urinario en individuos no expuestos de Curacaví son 5.2 veces mayores que los estándares internacionales propuestos para la excreción basal de este metabolito. Estos valores podrían indicar que un gran porcentaje de exposición a HAPs, por lo menos en la zona de Curacaví podría no estar asociado ni a la exposición ambiental ni al hábito de fumar. Otros factores que podrían explicar estos elevados niveles basales podrían ser la etnia y las condiciones alimenticias y/o nutricionales.

La elección de Curacaví como zona control estuvo fundamentada en los bajos niveles de contaminación del aire. Además, las similitudes climáticas y geográficas con la capital confirmaron su elección. También se consideró el hecho de que gran parte de los voluntarios ya habían participado en estudios anteriores, facilitándose así la toma muestras y el seguimiento.

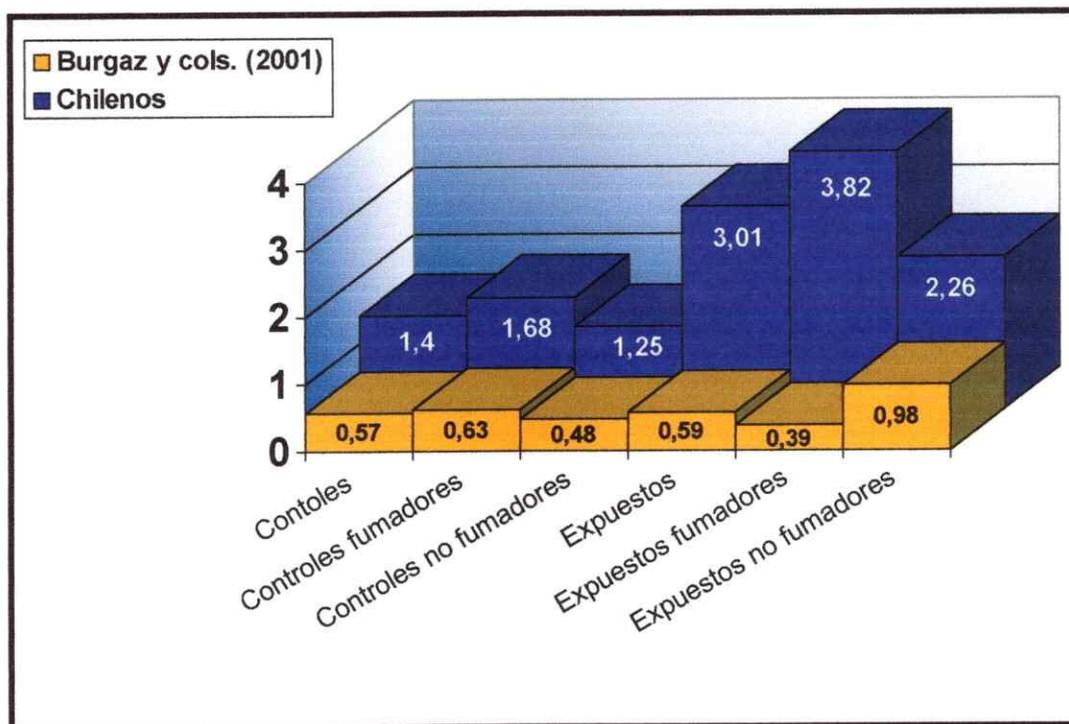
El nivel promedio de 3.015 μmol 1-OHP/mol de creatinina en los individuos expuestos a emisiones diesel resultó ser 2.15 veces superior al nivel mínimo reportado para el que no se observan efectos biológicos (1.4 μmol 1-OHP/mol de creatinina; Buchet y cols., 1992; Lauwerys, 1997). Los primeros efectos biológicos observados son el intercambio de cromátidas hermanas y la aparición de células de alta frecuencia (HFC), los que están asociados con la intensidad de la exposición a HAPs. También se han descrito aumentos significativos en el quiebre de hebras y en el n° de aductos de ADN en individuos expuestos laborales con niveles de 1-OHP urinario superiores a 1.9 y 3.8 μmol 1-OHP/mol de creatinina, respectivamente (Jongeneelen, 2001).

Concentraciones iguales o superiores a 2.3 μmol 1-OHP/mol de creatinina han sido descritas para trabajadores de hornos de mina de carbón (Jongeneelen y cols., 1990; Kuljukka y cols., 1996). Este valor es equivalente a 0.2 mg/m^3 de HAPs (ACGIH, 1998), siendo la estimación mínima

reportada para trabajadores de minas de carbón, que iguala al nivel en que se empiezan a observar efectos relacionados con HAPs (Jongeneelen, 2001)

Los niveles de 1-OHP urinario obtenidos en este estudio están entre los más altos descritos en la literatura (figura 21) y podrían explicarse por diferentes causas, como por ejemplo: 1) la alta frecuencia del alelo polimórfico m2 de CYP1A1 encontrada en las poblaciones estudiadas, 2) las modificaciones metodológicas introducidas en la detección de 1-OHP urinario, lo que permitiría detectar con mayor resolución y sensibilidad el metabolito, y 3) hábitos alimenticios de la población chilena, inclinados hacia el consumo de alimentos asados en exceso. No obstante, nuestros valores coinciden con los publicados recientemente en trabajadores de minas de carbón y de plantas de aluminio en Corea. Estos estudios han comunicado valores de 3.40 y 4.31 μmol de 1-OHP/mol de creatinina, respectivamente (Nan y cols., 2001; Alexandrie y cols., 2000).

Figura 21: Concentraciones de 1-OHP urinario en diferentes estudios



El hábito de fumar incrementa los niveles de 1-OHP en individuos expuestos a emisiones diesel (3.82 vs. 2.26 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina), sin embargo este incremento fue significativamente menor que el provocado por las emisiones diesel ($p\text{-value} = 0.523$, I.C.= -1.156658 - 2.262756). Esto sugiere que en estos individuos, la mayor fuente de exposición a HAPs corresponde a las emisiones diesel.

CYP3A4 es el tipo de citocromo P-450 más abundante en el hígado humano y también participa en la metabolización de HAPs. Sin embargo, hasta ahora

no ha sido asociado con la metabolización de pireno hasta 1-OHP ni con su excreción urinaria. En esta tesis se ha investigado la actividad CYP3A4, expresada como concentración de 6- β hidroxicortisol en la orina, la que resultó ser un buen biomarcador de riesgo para individuos expuestos laboralmente a emisiones de motores diesel.

Una leve inducción de CYP3A4 en hígado de rata por extractos orgánicos de material particulado ha sido descrita previamente (Adonis, 1999). La mayor dificultad para estudios de inducción en esta enzima es que su expresión constitutiva impide notar, por métodos tradicionales, pequeñas variaciones en el nivel de CYP3A4. Sin embargo, los datos obtenidos en este estudio y la inducción por extractos orgánicos reafirman el uso de la actividad de CYP3A4 como marcador de riesgo.

La relación logarítmica que se observa entre los datos de actividad de CYP3A4 y los niveles urinarios de 1-OHP hacen pensar en la participación de más de una enzima o sistema enzimático en el metabolismo de HAPs ambientales derivados de emisiones diesel.

La gran variabilidad de los niveles de 1-OHP en individuos que presentan una elevada actividad de CYP3A4 puede explicarse por una excesiva activación o inducción de CYP3A4 (sin la exclusiva necesidad de altos

niveles de HAPs) debido a otros componentes. Se ha descrito que algunos flavonoides, presentes en una gran cantidad de alimentos y bebidas pueden provocar una activación alostérica, potenciando la interacción entre la NADPH P-450 reductasa y CYP3A4. Los datos respecto a flavonoides son algo contradictorios, ya que existen publicaciones que hablan de un efecto inhibitorio sobre CYP3A4 (Chan y cols. 1998; Ho y cols., 2001), mientras que otras dicen que son capaces de activar a CYP3A4 (Schrag y Wienkers, 2001). Se necesita un estudio amplio para dilucidar que tipo de flavonoides actuarían como inhibidores y cuales como activadores. También se ha descrito que la inhibición de CYP3A4 es dependiente del sustrato (Schrag y Wienkers, 2001), lo que indicaría que en un exceso de sustrato, la metabolización de HAPs es independiente de la actividad de CYP3A4.

Los resultados de este estudio muestran que el hábito de fumar no produce variaciones en la influencia de CYP3A4 sobre los niveles de 1-OHP (3A4 es altamente significativo en los individuos expuestos fumadores y no fumadores). Esto sugiere que la principal vía de exposición a pireno (y por consiguiente, HAPs) es la inhalación ambiental, sobretodo en ambientes laborales. La exposición intradomiciliaria (exposición a emisiones de medios de calefacción que funcionan con leña, carbón o parafina) también fue descartada como factor importante en la relación actividad de CYP3A4 y niveles de hidroxipireno urinario, ya que al estratificar por esta variable, la

incidencia de este citocromo sigue siendo altamente significativa en los controles y en los expuestos.

La actividad CYP3A4 resultó ser levemente significativa en individuos no expuestos y no fumadores. Esto confirma la suposición de que, por lo menos en la zona de Curacaví, la exposición a HAPs no se debe en un 100% a la exposición ambiental o al humo del cigarrillo, sino que deben existir otros factores, como por ejemplo, los hábitos alimentarios.

Por otra parte, la condición heterocigota para el polimorfismo Msp1 (m1m2) mostró una incidencia significativa sobre los niveles de 1-hidroxipireno urinario en los individuos expuestos a emisiones diesel en ambientes laborales y urbanos.

En individuos expuestos a emisiones diesel, los portadores del alelo m2 presentaron, en promedio, niveles significativamente mayores de 1-OHP urinario comparado con las personas de genotipo m1m1 (3.43 vs. 2.36 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina, respectivamente). Esto indicaría que el alelo m2, como se ha descrito, participa activamente en la metabolización de HAPs presentes en ambientes laborales y puede ser considerado como un marcador de riesgo para este tipo de compuestos

Al utilizar en forma conjunta los biomarcadores de CYP1A1 y CYP3A4, se observó que la actividad CYP3A4 era mucho más significativa sobre los niveles de 1-OHP en individuos portadores de al menos una copia del alelo m2. Esto corrobora la hipótesis de que podría existir más de un sistema enzimático involucrado en la metabolización de HAPs y otros componentes ambientales tóxicos y que éstos podrían, además, actuar de forma sinérgica.

Los resultados encontrados respecto a CYP1A1 son coincidentes con otros estudios efectuados por Wu y cols., (1998) en trabajadores expuestos a emisiones de carbón. Algunos autores también han asociado el genotipo heterocigoto Ile/Val de CYP1A1, con los niveles urinarios de 1-OHP (Brescia y cols., 1999; Alexandrie y cols., 2000).

Estudios previos han demostrado los niveles de 1-OHP urinario son más elevados en individuos portadores de la delección para GSTM1 (GSTM1) que en las personas de genotipo GSTM1+ (Brescia y cols., 1999; Alexandrie y cols., 2000; Hong y cols., 1999). Además, Viezzer y cols. (1999) han demostrado que el genotipo GSTM1- incrementa el nivel de aductos de ADN en trabajadores de hornos de minas de carbón que fuman y que están expuestos a altos niveles de HAPs.

En nuestro estudio no se observaron asociaciones significativas entre la delección del gen de la glutatión S-transferasa M1 y los niveles urinarios de 1-OHP. Esto es coincidente con los hallazgos del estudio realizado por Nan y cols. (2001) en trabajadores coreanos de plantas de carbón. Los valores promedio de 1-OHP urinario publicados en este estudio para GSTM1+ y GSTM1- (3.37 y 3.35 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina, respectivamente) son similares a los obtenidos en esta tesis (3.11 y 3.14 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina). En la mencionada investigación se encontró una relación entre GSTM1- y los niveles urinarios de 2-naftol pero no con 1-OHP, lo que indicaría que GST podría jugar un rol importante en el metabolismo de HAPs de bajo peso molecular, como el naftaleno (2 anillos aromáticos) y no en el de pireno (4 anillos), lo que explicaría la falta de asociación entre GSTM1 y 1-OHP. Otra posible explicación sería que los compuestos conjugados con glutatión (producto de la acción de GSTM1), se eliminan preferentemente en la bilis, debido a su alto peso molecular y no por la orina, donde se detectó el 1-hidroxicipireno. También se ha descrito que la delección de GSTM1 estimularía la vía de glucoronidación como resultado de la acumulación de derivados de HAPs que, en caso de que el gen GSTM1 estuviera intacto, serían conjugados con glutatión.

Existen datos contradictorios respecto al papel que juega GSTM1 en los niveles de 1-OHP. Algunos estudios indican que la ausencia de esta enzima

tiene una influencia significativa en la modulación de la excreción del 1-OHP (Hong y cols., 1999; Schoket y cols., 2001), mientras que otros no le otorgan influencia o sólo le dan una influencia marginal en la concentración urinaria de este metabolito (Overbo y cols., 1998; van Delft y cols., 2001).

Otro problema ambiental de gran importancia para la salud humana, en Chile, es la exposición a arsénico. Los habitantes de la Segunda Región han estado por muchos años expuestos a arsénico en agua potable y posiblemente a otros agentes reconocidamente cancerígenos. Smith y cols. (1998) han asociado las altas tasas de cáncer de hígado y pulmón en esta región y su elevado índice de mortalidad con la ingesta de arsénico inorgánico en el agua potable. También elevadas concentraciones de Arsénico en aire se han detectado en las emisiones de fundiciones de cobre y estas han sido relacionadas con altas tasas de cáncer pulmonar entre sus trabajadores.

Diversas especies de arsénico se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente ya sea en agua, suelo o aire. El arsénico ha sido clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USA-EPA) con la prioridad más alta en una lista de las 20 sustancias más peligrosas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997). En poblaciones humanas expuestas, el arsénico ha sido principalmente asociado con tumores de piel y

pulmón, pero también ha sido relacionado con tumores de vejiga, riñón e hígado (Thomas y cols., 2001). La asociación entre exposición a arsénico y diversos tipos de cáncer ha sido observada en poblaciones expuestas de Taiwán, China, Bangladesh, Estados Unidos, México, Argentina y Chile (Simeonova y Luster, 2000). Tomando como base diversos estudios epidemiológicos se ha sugerido que el riesgo de tener cáncer por exposición a arsénico es comparable al del humo de tabaco ambiental con un riesgo estimado de 1 por mil (Simeonova y Luster, 2000).

Aunque el arsénico es claramente un carcinógeno humano, aún no se ha esclarecido el mecanismo celular preciso por el cual induce cáncer. Se cree que no actúa por el mecanismo clásico de genotoxicidad y mutagenicidad como lo hacen otros metales tales como el cadmio y el cromo. Se ha sugerido que podría actuar por un mecanismo epigenético a nivel de promoción tumoral, modulando las vías de señales responsables del crecimiento tumoral (Simeonova, 2000).

El arsénico es el único agente que ha sido clasificado definitivamente por la IARC como un carcinógeno exclusivamente humano, debido a que las evidencias de carcinogenicidad en animales han sido consideradas como inadecuadas (IARC 1980, 1987). Por lo tanto existe la posibilidad que el ser

humano sea más susceptible a desarrollar cáncer asociado a arsénico que los animales

Diversos modos de acción para la carcinogénesis de arsénico han sido propuestos y estos incluyen: aberraciones cromosómicas, reparación alterada del ADN, stress oxidativo, metilación alterada de ADN, modificación de la proliferación celular (Thomas y cols., 2001). Algunos de estos efectos no son necesariamente únicos sino que podrían ocurrir en conjunto o en secuencia.

La susceptibilidad humana a cáncer inducido por arsénico y el desconocimiento sobre el mecanismo de carcinogenicidad además de provocar preocupación como un problema prioritario de salud pública, representa un desafío importante en la evaluación de riesgo de poblaciones expuestas.

Debido a las altas tasas de incidencia y de mortalidad por cáncer pulmonar en la II región, es urgente desarrollar métodos para detectar este tipo de cáncer en sus etapas iniciales y en lo posible identificar a los individuos genéticamente más susceptibles.

Las altas tasas de mortalidad de cáncer pulmonar en la segunda región, comparada con las de otras regiones y con la tasa promedio del país sugieren que el arsénico en agua potable podría ser la causa principal de estas diferencias. En este estudio el 38 % de las personas con cáncer pulmonar son no fumadores lo cual apoya la importancia de la exposición a arsénico en la incidencia de la enfermedad. Sin embargo el hecho que el 62 % sean fumadores sugiere que la exposición HAPs también podría ser un factor responsable de la alta incidencia de cáncer pulmonar en la región.

Muy poco se sabe de la interacción entre diversos carcinógenos ambientales en la incidencia de cáncer pulmonar. Numerosos trabajos han demostrado en distintas poblaciones la relación entre cáncer pulmonar y polimorfismos en enzimas de biotransformación de HAPs (Alexandrie y cols., 1994; Kawajiri y cols., 1996; Taningher y cols., 1999), pero no se han publicado estudios sobre estas relaciones en personas expuestas a HAPs y a arsénico.

Este estudio preliminar ha tenido por objetivos: a) estudiar la influencia de polimorfismos relacionados al metabolismo de HAPs en la incidencia de cáncer pulmonar en la II Región, en personas expuestas a arsénico y b) evaluar (en sangre) un biomarcador que permite detectar de manera rápida y sensible la presencia de un antígeno de la pared tumoral cuyos niveles podrían estar relacionadas a la detección de cáncer pulmonar.

Albores y col. (1995) han demostrado que el arsénico puede causar una inducción selectiva de CYP1A1 en hígado de rata lo cual probablemente incrementaría la producción de dioles-epóxidos, los carcinógenos finales que forman aductos con ADN (HAPs-ADN). Basándose en estos antecedentes, se puede suponer que la exposición simultánea a carcinógenos que actúan por mecanismos de acción genotóxicos (HAPs) y posiblemente epigenéticos (arsénico) podría alterar la respuesta carcinogénica.

La exposición a HAPs generalmente está relacionada a metales como co-contaminantes. Estos compuestos se encuentran entre las sustancias de mayor toxicidad en el ambiente. La ATSDR (2001) ha publicado una nueva lista de prioridades de sustancias peligrosas, basada en su presencia en el ambiente, toxicidad y potencial de exposición a humanos. En esta lista, el arsénico, plomo y mercurio ocupan los tres primeros lugares, cadmio el 7° y los HAPs figuran en la 9° posición. Vakharia y cols. (2001) ha postulado que los metales podrían disminuir el potencial carcinogénico de los HAPs, ya que reducirían la inducción de CYP1A1. De este modo, el arsénico podría disminuir en un 57% la inducción de CYP1A1 por benzo(a)pireno en células HepG2 humanas, mientras que el cadmio la reduciría en un 82%. A pesar de esto, no se pueden descartar muchos otros factores que podrían influenciar la carcinogenicidad de los HAPs.

En este estudio no se han determinado niveles de exposición a arsénico, sin embargo estas investigaciones sobre la relación entre cáncer pulmonar y polimorfismos en enzimas de biotransformación de HAPs consideran que en la población estudiada tanto controles como individuos con cáncer pulmonar han residido en la zona por al menos 10 años, lo cual sugiere que han estado expuestos a altos niveles de arsénico en agua (al menos 50 ug/L a partir de 1970 y sobre 500 ug/L entre 1958 y 1969) y en algunos casos además a emisiones de arsénico en aire (individuos que han trabajado en faenas mineras en plantas de fundición de minerales).

Los resultados de este estudio sobre el polimorfismo Msp1 en CYP1A1 en individuos sanos y con cáncer pulmonar de Antofagasta muestran que la frecuencia del alelo m2 fue 0.41 y 0.46 respectivamente. Estas frecuencias no difieren significativamente entre ambos grupos, pero, sin embargo, la frecuencia obtenida en la población control, al igual que en los estudios realizados también en una población control de Curacaví, indican que estas frecuencias están entre las más elevadas descritas en la literatura y posiblemente representan un factor de riesgo importante ante una exposición a HAPs.

Al realizar análisis de riesgo basado en el cálculo de *Odds Ratios*, se determinó en la población total estudiada que la presencia del alelo polimórfico m2 es un factor de riesgo significativo para cáncer pulmonar asociado a HAPs (O.R.=2.08 I.C.=1.04 - 4.03). Esto a pesar de que las frecuencias para este alelo entre el grupo de pacientes con cáncer pulmonar y el de controles de la II región no difieren significativamente (0.46 vs. 0.41, respectivamente).

Al estratificar por hábito de fumar, la O.R. subió a 2.3, estando en el borde de la significancia ($p= 0.0736$, I.C.= 0.95 – 5.26). Es probable que al aumentar el N de la muestra analizada, estos valores aumentarían y fueran significativos, ya que en el humo del cigarrillo se han detectado HAPs y otros agentes cancerígenos que son directamente inhalados. En el humo del cigarro también se ha encontrado arsénico pero los niveles son muy inferiores a los encontrados en agua potable (U.S. Public Health Service, 1989)

En los no fumadores no se encontraron incidencias significativas del alelo m2 (O.R.= 1.93, $p=0.25$, I.C.=0.7 – 4.76). Una posible explicación a estos resultados es que al reducir una de las vías importantes en la exposición a HAPs, disminuye considerablemente el riesgo de desarrollar cáncer pulmonar asociado a este tipo de compuestos (aunque todavía existe, ya que O.R.>1), y disminuye también el posible efecto sinérgico que podrían tener

estos compuestos con otros agentes cancerígenos como por ejemplo arsénico.

Al estratificar por sexo, los hombres mostraron una incidencia significativa del polimorfismo Msp1 en el riesgo de cáncer pulmonar (O.R.= 2.6 I.C.=1.07-5.94), a pesar de que también en este caso, las frecuencias no presentan diferencias significativas (0.46 en cáncer contra 0.39 en controles). Esto confirma datos de otros estudios en los cuales se ha demostrado que, en general, el cáncer tiene mayor incidencia en individuos de sexo masculino (Anuario del registro regional de cáncer, 1999). Diversos factores pueden contribuir a esta mayor susceptibilidad en la II Región. Por una parte los hombres fuman mas que las mujeres y por otra como la II Región es una zona eminentemente minera, son los hombres quienes trabajan en las minas y en sus inmediaciones, viéndose expuestos generalmente por muchos años a las emisiones de HAPs de maquinarias y hornos que en su mayoría funcionan con petróleo diesel.

En el grupo de las mujeres no se observaron efectos significativos de este polimorfismo, a pesar de que las frecuencias del alelo m2 son similares que en el grupo de hombres. Una posible explicación podría estar asociada a una menor exposición a HAPs en mujeres. Además, la inducción y la actividad de CYP1A1 podrían estar relacionadas con hormonas femeninas, las que actuarían competitivamente con los HAPs, tal como lo sugirieron Thomsen y cols. (1994).

La toxicidad y carcinogenicidad por la exposición a arsénico están relacionadas a su metabolismo a nivel celular, sin embargo, otros factores como la etnia, el estado nutricional o la presencia de otros compuestos químicos en el agua potable también se deben tomar en cuenta al analizar la toxicidad de del arsénico.

Es sabido desde hace muchas décadas que en humanos y en otras especies el arsénico inorgánico (iAs) es biotransformado a metabolitos mono y dimetilados, y estas biotransformaciones han sido consideradas como un mecanismo de detoxificación de iAs (Vather y cols., 1984). Sin embargo, el mayor conocimiento que se tiene acerca del funcionamiento de las vías metabólicas involucradas y nuevas técnicas que han permitido detectar otros metabolitos, han cambiado la manera de interpretar el significado del proceso de metilación. Thomas y cols. (2001) han investigado la presencia de metabolitos mono y dimetilados (MMA y DMA) que contienen arsénico en estado trivalente y han logrado identificarlos tanto en células humanas en cultivo expuestas a arsénico como en la orina de individuos crónicamente expuestos a este metaloide. Además, han establecido que estos metabolitos son más citotóxicos, más genotóxicos y mejores inhibidores de la actividad de algunas enzimas que el iAs^{3+} . De acuerdo a estos nuevos antecedentes, se ha podido comprender mejor el proceso que controla el estado de oxidación del arsénico y la formación, distribución y excreción de los

derivados mono y dimetilados. Con esta información, parece razonable definir la metilación del As como un proceso de activación metabólica en circunstancias que hasta hace muy poco era considerado como un proceso detoxificación. Por lo tanto la retención de monometil y dimetil As^{3+} en los tejidos sugiere que estos compuestos podrían ser responsables en gran parte de los efectos tóxicos del arsénico.

Como se ha señalado anteriormente los genes para la Glutación S-transferasas codifican para una serie de isoenzimas que catalizan la conjugación de GSH con una serie de diversos metabolitos tóxicos y mutagénicos incluyendo dioles-epóxidos que resultan del metabolismo de HAPs por diversos CYP-450, como también de productos de lípidos y ADN generados por estrés oxidativo. Las GSTs son consideradas enzimas de detoxificación que juegan un rol importante como mecanismo de protección contra la carcinogénesis química. Diversos estudios han sugerido que el GSH participaría en dos procesos: a) la conjugación directa con arsénico y b) el paso previo al de metilación que es la reducción inicial de arsenato a arsenito. Este último es la forma de arsénico preferida para la metilación. Individuos con genotipos nulos para GSTM1 y GSTT1 son considerados como un grupo de alto riesgo a diversos cánceres debido a su deficiencia de GSH.

El iAs que entra al organismo a través de ingestión es rápidamente absorbido en el torrente sanguíneo y transportado principalmente al hígado, donde una parte es metilado a MMA y DMA, los cuales son excretados más eficientemente por la orina. El As se puede unir a componentes intracelulares y acumularse en tejidos como el pulmón, riñón, uñas, pelo, etc. Una baja capacidad de metilación podría incrementar la retención corporal de arsénico, sin embargo la capacidad de metilación parece no estar relacionada con el nivel de exposición de As (Hung et al, 1997).

La disminución de los niveles de glutatión hepático se ha relacionado con una drástica disminución de los niveles de MMA y DMA en orina de animales indicando que el tripéptido juega un rol importante en la metilación de iAs (Buchet y cols., 1987). La detoxificación de compuestos electrofílicos endógenos y exógenos por conjugación con GSH generalmente requiere de actividad GST. Se podría pensar que bajos niveles de actividad GST disminuirían la función de detoxificación del GSH y por lo tanto, se podría especular que los humanos con genotipos nulos para GSTM1 y GSTT1 podrían tener diferentes capacidad para metilar y para retener iAs en el organismo que individuos con los genotipos no nulos.

Hung y cols. (1997), en estudios realizados en Taiwán relacionaron la presencia del genotipo nulo para GSTM1 con un incremento en el porcentaje

de iAs en orina sugiriendo que GSTM1 facilitaría la metilación de iAs y que por lo tanto individuos con la delección para GSTM1 no metilarían eficientemente y tendrían además un aumento en el porcentaje de iAs corporal retenido.

En este estudio no se investigó la presencia en orina de iAs ni derivados metilados en distintos estados de oxidación de As. La presencia por si sola de la delección de GSTM1 no presentó valores significativos en el riesgo de cáncer pulmonar en ninguno de los grupos de estudiados ya sea en población total o estratificada por hábito de fumar y por sexo. Existen trabajos (Rebbeck, 1997; Zaho y cols., 2001) en la literatura que han encontrado una asociación significativa entre la presencia de la delección de GSTM1 y el cáncer pulmonar, pero también hay otros investigadores que piensan que atribuirle a GSTM1 la responsabilidad de un incremento en el riesgo de cáncer pulmonar puede ser una interpretación muy simplista, ya que no se considera el efecto de las diferentes variantes alélicas de este gen o de otros genes de la misma familia (To-Figueras y cols., 1997). El hecho que en esta investigación no se haya demostrado un efecto significativo de la presencia de la delección de GSTM1 en la incidencia de cáncer pulmonar puede deberse también a que con la metodología utilizada sólo se detectaron dos tipos de genotipos: GSTM1 (+) y GSTM1 (-), dejando de lado la condición heterocigota, que también ha sido asociada a cáncer pulmonar.

El valor de 0.86 para la O.R. de hombres con cáncer pulmonar de Antofagasta, indicaría que el riesgo podría estar asociado a la presencia del gen completo (GSTM1 +), dado que el valor es menor que 1 y el análisis se hizo considerando a GSTM1(-) como el factor de riesgo. Esto es explicable si se considera que GSTM1, en su estado normal, estaría involucrada en la metilación de los iAs, generando metabolitos mono y dimetilados, que recientemente han sido descritas como más tóxicas que los iAs.

Para los individuos con cáncer pulmonar fumadores y expuestos a arsénico tampoco se observó una asociación entre el riesgo de cáncer pulmonar y el genotipo nulo para GSTM1. En cambio la correlación fue significativa cuando el análisis incluyó además el polimorfismo Msp1 para CYP1A1 lo cual indicaría que la inducción provocada por el polimorfismo en CYP1A1 generaría más metabolitos electrofílicos (carcinógenos finales), como por ejemplo los dioles-epóxidos de HAPs, los cuales se acumularían debido a que el genotipo nulo no permitiría conjugarlos y eliminarlos. El riesgo de cáncer pulmonar incrementó aún más al incluir el polimorfismo en el codón 72 de la proteína p53 (Irrarázabal y cols., 2001) sugiriendo que la evaluación del riesgo es mejor cuando el análisis incluye más de un posible efecto (ej. la presencia de polimorfismos en enzimas de biotransformación de carcinógenos y presencia de polimorfismos que generan mutaciones en genes supresores de tumores).

La importancia de disponer de un ensayo para detectar un posible cáncer pulmonar que sea rápido, simple, económico y que se pueda realizar por técnicas no invasivas nos motivó a utilizar en este estudio el kit DR-70. Los resultados obtenidos de la determinación de los niveles séricos del antígeno DR-70 demuestran claramente una alta especificidad y sensibilidad (99 y 94 %, respectivamente).

Los pacientes con cáncer pulmonar que no recibieron ningún tipo de tratamiento mostraron niveles significativamente mayores que los controles. El nivel promedio de estos pacientes fue de 10.41, con un rango de 1.29 – 20.96, mientras que en los controles el promedio registrado fue de 1.77 (0.01 – 6.38). En el 87.8 % de los casos de cáncer pulmonar, los valores de DR-70 fueron superiores a 6 µg/ml., valor considerado como umbral de respuesta positiva. Esto indica una baja aparición de falsos negativos.

Los resultados sugieren que este ensayo podría ser también utilizado para un seguimiento del tratamiento de la enfermedad. El nivel promedio detectado en pacientes que han recibido algún tipo de tratamiento, ya sea quimioterapia, radioterapia u otro, fue de 1.74 (0.89 - 5.26), valor muy cercano al de los controles y que difiere significativamente del promedio en los casos de cáncer que no recibieron tratamiento.

El ensayo logró también discriminar efectivamente entre casos de cáncer pulmonar diagnosticados y pacientes con otras enfermedades respiratorias, excepto en algunas personas con bronquioectasis, que registraron valores superiores a 6 µg/ml. Estos resultados evidencian un riesgo disminuido de obtener falsos positivos si se conoce bien el historial clínico del paciente. Los tumores benignos de otros tejidos y otros tipos de cáncer no provocaron falsos positivos. En el caso de los tumores benignos, el promedio fue de 2.58 (0.91 – 6.54) y en los otros tipos de cáncer el nivel promedio fue de 1.65 (1.21 – 2.08).

En resumen este ensayo demostró una alta especificidad, es fácil de aplicar, de costo relativamente bajo y sus resultados se obtienen rápidamente. Aplicado en conjunto con otros sistemas de diagnóstico puede ser de gran utilidad para la detección del cáncer pulmonar y para el seguimiento de los tratamientos.

En conclusión los resultados de este estudio concuerdan con otras investigaciones que han demostrado que la exposición a arsénico en agua potable, en lugares de trabajo y posiblemente en aire, es responsable de la alta incidencia y mortalidad de cáncer pulmonar en la segunda región. El aporte más importante de esta investigación es que demuestra que la alta

incidencia del alelo m2 en el polimorfismo CYP1A1 en conjunto con la deleción en GSTM1 incrementa el riesgo de cáncer pulmonar en personas expuestas a una mezcla de arsénico y HAPs sugiriendo que el hábito de fumar y la exposición a HAPs provenientes de fuentes de contaminación potencian el efecto de arsénico en la incidencia de esta enfermedad. Estos resultados concuerdan con los estudios epidemiológicos publicados recientemente por Ferreccio y cols. (2000) en los cuales demuestran que pacientes fumadores expuestos a concentraciones de Arsénico mayores que 200 µg/ml, en agua potable presentan una O.R. de 32 (I.C.=7.22-198.0), que difiere significativamente con el valor esperado para estas personas, basándose en la O.R. de pacientes no fumadores expuestos a los mismos niveles de arsénico. Considerando que el cáncer es una enfermedad poligenética y multifactorial, sería arriesgado el uso clínico de un ensayo basado únicamente en el análisis de unos pocos genes. Al aumentar la cantidad de genes analizados, se puede mejorar el diagnóstico para determinar susceptibilidad a cáncer pulmonar. Técnicas como ADN *array* ofrecen interesantes perspectivas para este tipo de estudios ya que por una parte permiten analizar la expresión de gran cantidad de genes en tejidos sanos y tumorales y por otra evaluar el rol de diversos polimorfismos. Esta técnica será de gran utilidad para comprender las interacciones de diversos agentes cancerígenos en la incidencia de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de esta Tesis pueden resumirse como se indica a continuación:

- El 1-hidroxi pireno urinario resultó ser un excelente indicador de exposición a pireno, y dado que este compuesto está siempre presente en mezclas ambientales de HAPs, se puede concluir que este metabolito, junto al monitoreo de parámetros ambientales del sitio de estudio, es de gran utilidad para determinar niveles biológicamente efectivos de exposición a HAPs.
- El 1-hidroxi pireno puede ser usado como biomarcador de exposición a HAPs, especialmente de material particulado (en este caso, a exposición de material particulado proveniente de diesel). Puede ser un buen indicador para obtener información sobre exposición a $MP_{2.5}$ y sus efectos en la salud. La información generada puede ser tomada en cuenta para la posible implementación en Chile de una norma para $MP_{2.5}$.
- La concentración de 1-OHP urinario fue significativamente mayor en individuos expuestos a emisiones diesel que en individuos no expuestos
- Se encontraron diferencias significativas en los niveles urinarios de 1-OHP de individuos fumadores y no fumadores en los grupos de

expuestos y no expuestos a emisiones diesel. Sin embargo, el incremento en los niveles de 1-OHP provocado por el hábito de fumar es significativamente menor que el que provocan las emisiones diesel. Esto sugiere que éstas últimas serían las principales responsables de la exposición a HAPs.

- Los niveles de 1-OHP urinario fueron significativamente mayores en individuos expuestos a emisiones diesel portadores del alelo polimórfico m2 de CYP1A1 (m1m2 y m2m2), lo que indicaría, tal como se ha descrito, que la variante Msp1 de CYP1A1 sería capaz de modificar el metabolismo de HAPs en ambientes laborales con altas concentraciones de HAPs.
- La actividad CYP3A4 influye significativamente en los niveles de 1-OHP de individuos expuestos a emisiones diesel. Este es uno de los hallazgos más importantes de esta investigación, ya que se describe por primera vez una correlación entre la actividad CYP3A4 y exposición a HAPs.
- La delección del gen GSTM1 no presentó asociaciones significativas con los niveles de 1-OHP urinario ni por si sola ni combinada con CYP1A1 o CYP3A4. Tampoco se encontró ninguna correlación al considerar

individuos que presentaban niveles elevados de 1-OHP (sobre 2.3 μmol / mol de creatinina, nivel propuesto para trabajadores expuestos)

- Tanto en las plantas de revisión técnica como en Curacaví, el hábito de fumar no es la principal causa de exposición a HAPs. En el caso de Santiago (expuestos laborales y urbanos), las emisiones de los motores diesel y en menor medida, los hábitos alimenticios y exposición intradomiciliaria son las mayores fuentes de exposición a HAPs. En Curacaví, las costumbres alimenticias y exposición a carbón (braseros) parecen ser las responsables.
- Las frecuencias del alelo m2 detectadas en los diferentes grupos de estudio han sido las más altas descritas en la literatura, junto con las encontradas en poblaciones mapuches por Muñoz y cols. (1998).
- La presencia simultánea del alelo mutado m2 de CYP1A1 y de la delección homocigota del gen que codifica para la glutatión S-transferasa M1 puede ser considerada como un factor de riesgo para cáncer pulmonar.
- El riesgo de cáncer pulmonar en Antofagasta de las personas portadoras de al menos una copia del alelo m2 es significativamente mayor comparadas con las que poseen genotipo m1m1. También se encontró

que el riesgo se asocia principalmente a hombres y posiblemente al hábito de fumar.

- Los resultados obtenidos con el kit DR-70 mostraron claramente su alta especificidad y sensibilidad. Esta información sugiere que el ensayo de DR-70, en complemento con las técnicas clínicas clásicas, puede ser usado como un elemento de detección precoz y como instrumento de seguimiento del tratamiento clínico del cáncer pulmonar en Chile.
- Este estudio es uno de los pocos en la literatura mundial que investiga la relación entre cáncer pulmonar asociado a arsénico y polimorfismos en enzimas de biotransformación.

REFERENCIAS

- ACGIH (1998) Documentation of TLVs and BEI, 1993 with updates 1997 and 1998. ACGIH, Cincinnati, OH.
- Adonis M. y Gil L. (1993). Mutagenicity of organic extracts from Santiago (Chile) airborne particulate matter. *Mutation Research* 292: 51-61.
- Adonis, M. (1999). Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons in Santiago, Chile. Tesis para optar al título de PhD, University of Surrey, England. 163p
- Adonis, M., y Gil, L. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons levels and mutagenicity of inhalable matter in Santiago, Chile. *Inhalation Toxicology*, 12:1173-1183.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Public Health Service. (1989). Toxicological profile for arsenic. Washington, DC: US Public Health Service. (Publication no. ATSDR/TP-88/02).
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (1993). Toxicological profile for arsenic (update). TP-92/02. ATSDR, Atlanta, GA, 175 pp. plus appendices.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1997) Top 20 Hazardous Substances: ATSDR/EPA Priority List for 1997. <http://atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/cxcx3.html>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2001). CERCLA Priority List Hazardous Substances. < <http://www.atsdr.cdc.gov/clist.html>> consulta: 05 de abril de 2002
- Albores A, Sinal CJ, Cherian MG, Bend JR. (1995). Selective increase of rat lung cytochrome P450 1A1 dependent monooxygenase activity after acute sodium arsenite administration *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 73(1):153-8.
- Alexandrie, A., Sundberg, M. I., Seidegard, J., Tornling, G., y Rannug, A. (1994). Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis (Lond.)*. 15: 1785-1790.
- Alexandrie, A., Warholm, M., Carstensen, U., Axmon, A., Hagmar, L., Levin, J., Ostman, C., Rannug, A. (2000) CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis* 21(4):669-76.
- Ambrosone C., Freudenheim J., Graham S., Marshall J., Vena J., Brasure J., Laughlin R., Nemoto T., Michalek A., Harrington A., Ford T. y Shields P. (1995). Cytochrome P4501A1 and Glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Research* 55: 3483-3485.

- Amirimani B, Walker AH, Weber BL, Rebbeck TR. (1999). Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *Journal of National Cancer Institute* 91:1588-1590.
- Anuario del registro nacional de cancer. II región Antofagasta Chile (1999).
- Aposhian, H., Zakharian, R., Wu, Y., Healy, S. y Aposhian, M. (1997). Enzymatic methylation of varsenic compounds: II-An overview. In *Arsenic Exposure and Health Effects* (C.O. Abernathy, L. Calderón, y W.R. Chappel, Eds.), pp 298-321. Chapman and Hall, London
- Autrup, H. (2000). Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutation Research* 464: 65-76
- Barrett JC, Lamb PW, Wang TC, Lee TC. (1989). Mechanisms of arsenic-induced cell transformation. *Biological Trace Elements Research* ;21:421-9.
- Bartsch, H., Nair, U., Risch, A., Rojas, M., Wilkman, H. Y Alexandrov, K. (2000). Genetic Polymorphism of CYP genes Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 9: 3-28.
- Borgen, A., Darvey, H., castagnoli, N., Crocker, T.T., Rasmussen, R.E., y Wang, I.Y. (1973). Metabolic conversion of benzo[a]pyrene by Syrian hamster liver microsomes and binding of metabolites to deoxyribonucleic acid. *Journal of Medicinal Chemistry* 16, 502-506.
- Boyer, T. (1989). Glutathione S-transferase: An update. *Hepatology* 9(3): 503-517.
- Brescia, G., Celotti, L., Clonfero, E., Neumann, G.H., Forni, A., Foa, V., Pisoni, M., Ferri, G.M., Assennato, G. (1999). The influence of cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke-oven workers. *Archives of Toxicology* 73(8-9):431-9.
- Brzeznicki S., Jakubowski M., Andczerski B. (1997). Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 70(4): 257-260.
- Buchet, J.P. y Lauwerys, R. (1987). Study of factors influencing the in vivo methylation of inorganic arsenic in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 91 65-74
- Buchet, J. P., Gennart, J. P., Mercado-Calderon, F., Delavignette, J. P., Cupers, L. y Lauwerys, R. (1992) Evaluation of exposure to PAH in a coke production and graphite electrode manufacturing plant. *British Journal of Industrial Medicine* 49, 761-768.
- Buetler, T. y Eaton, D.L. (1992). Glutathione S-transferases: amino acid sequence comparison, classification and philogenetis relationship. *Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews*, 10: 181-203.

- Burgaz, S., Cakmak, G., Karahalil, B., Karakaya A. (2001). Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. *Chemosphere* 47: 57-64.
- Chan, W., Nguyen, L., Miller, V., Harris, R. (1998). Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 3A4 by grapefruit juice and red wine. *Life Sciences* 62(10):PL135-42
- Chen, C.J., Chen, C.W., Wu, M.M., Kuo, T.L. (1992). Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *British Journal of Cancer*; 66:888-92.
- Chen, G.Q., Shi, X.G., Tang, W.(1997). Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As₂O₃ exerts dose dependent dual effects on APL cells. *Blood* 89:3345-3353
- Chen, H., Liu J., Merrick, B.A., Waalkes M.P. (2001). Genetic events associated with arsenic-induced malignant transformation: application of cDNA microarray technology. *Molecular Carcinogenesis* 30(2): 79-87.
- Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Liaw, K.F., y Chen, J.C. (1995) Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven years follow-up study in Taiwan. *Cancer Research*; 55:1296-1300
- Chiou, H.Y., Hsueh, Y.M., Hsieh, L.L., Hsu, L.I., Hsu, Y.H., Hsieh, F.I., Wei, M.L., Chen, H.C., Yang, H.T., Leu, L.C., Chu, T.H., Chen-Wu, C., Yang, M.H., Chen, C.J. (1997). Arsenic methylation capacity, body retention, and null genotypes of glutathione S-transferase M1 and T1 among current arsenic-exposed residents in Taiwan. *Mutation Research*;386(3):197-207
- Clonfero E, Zordan M y Venier P. (1989). Biological monitoring of human exposure to coal tar. Urinary excretion of total polycyclic aromatic hydrocarbons, 1-hydroxypyrene and mutagens in psoriatic patients. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 61; 363-368.
- CODELCO-Chuquicamata (1993). Programa de control de trabajadores expuestos a arsénico de origen laboral. Chile: Informe técnico.
- Comstock K. F., Sanderson B. J. S., Clafin G. y Henner W. D. (1990). GST gene deletion determined by polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* 18 (12): 3670.
- CONAMA (2001). Plan de prevención y descontaminación atmosférica.
- de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S., van den Anker, J.N. (1999). Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clinical Pharmacokinetics*; 37:485-505.

- Dennisenko, M., Pao, A., Tang, M. y Pfeifer, O. (1996). Preferential formation of benzo[a]pirene adducts at lung cancer mutational hotspots in P-53. *Science* 274: 430-432
- Dipple, A. (1994). In DNA adducts: Identificación and Biological Significance. pp107-129 IARC Scientific Publications, Lyon, France
- Directory of P450-containing Systems [en línea] <<http://www.icgeb.trieste.it/~p450srv/>>. Consulta realizada el 26 de noviembre de 2001
- Environmental Protection Agency. Risk assessment forum. Special report on ingested inorganic arsenic: skin cancer, nutrition essentiality. Washington, DC: Environmental Protection Agency, (1988). of chronic arsenic poisoning. *Republic Institute of Pathology of the National Taiwan University*;19:7-13.
- Enterline, P., Day, R. y Marsh, G. (1995). Cancer related to exposure to arsenic at a copper smelter. *Occupational and Environmental Medicine*. 52, 28-32.
- Ferreccio, C., González, C., Milosavjlevic, V., Marshall, G., Sacha, A.M. y Smith, A. (2000). Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology* 11 (6): 673-79.
- Fujisawa-Sheara, A., Sogawa, K., Yamane, M., y Fujii-Kuriyama, Y. (1987). Characterization of Xenobiotics responsive elements upstream from drug metabolising cytochrome P-450c gene: a similarity to glucocorticoids regulatory elements, *Nucleic Acids Research*. 15, 4179-4191.
- Gamble J.F. y Lewis R. (1996). Health and respirable particulate (PM10) air pollution: a causal or statistical association?. *Journal of Environmental Health Perspectives*, 104(8):838-850.
- Gamble, J.F. (1998). PM 2.5 and mortality in long term perspective cohort studies: Cause effect or statistical association?. *Environmental Health Perspectives*; 106(9):535-549
- Gibson G. y Skett P., Introduction to drug metabolism, (1989). Londres, Chapman and Hall. 293p.
- Gil, L., Adonis, M., Silva, M., Quiñones, L., y Salazar, I. (1991). Agentes Cancerígenos en el smog de Santiago. *Ambiente y Desarrollo*, 7: 64-70
- Gil, L., Irrázabal, C., Daud, P., y Polo Peña, M. (1993). Niveles de los principales contaminantes atmosféricos regulados en Santiago e Chile, Ciudad de México y ciudades de los Estados Unidos. *Amb. Desarrollo* 9:74-79.
- Gil L. y Adonis M. (1996). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Levels and Mutagenic Activities of Organic Extracts from Airborne Particles in Santiago of Chile. *Indoor Built Environ* 5:155-164.}

- Green, S. (1992). Nuclear receptors and chemical carcinogenesis. *TIPS* 13: 251-251.
- Guerrero R., Justice G., Rounds R., Thangiani H., Tchekmedyian N., Shah K., Eilbert M., Evans J. y Bald E. (1992). Ring shaped particle (RSP);: A new tumor marker for lung cancer that accurately discriminates between primary lung cancers and normal including chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and smokers: *ASCO Proceedings, Volume II May 17, San Diego, California*.
- Gundel, J., Mannschreck, C., Buttner, K., Ewers, U. y Angerer, J. (1996) Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 585-590.
- Hall, M. Grover, P. (1990). Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumor initiation, in: C.S. Cooper, P.L. Grover (Eds.) *Handbook of experimental pharmacology*, Vol. 94/I, Springer-Verlag, Berlin, pp 327-372
- Hashimoto, G., Toide, K., Kitamura, R., Fujita, M., Tagawa, S., Itoh, S. y Kamataki T. (1993). Gene structure of CYP3A4, an adult form specific of cytochrome P-450 in humans liver, and its transcriptional control. *European Journal of Biochemistry*; 218:585-95
- Hayashi S., Watanabe J., Nakachi K., y Kawajiri K. (1991). Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with aminoacid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 IA1 gene. *Journal of Biochemistry* 110: 407-411.
- Hayes, J., Pulford, D. (1995). The glutathione s-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzyme to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30(6): 445-600.
- Hei, T.K., Liu, S.X. y Waldren, C. (1998). Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: Role of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America: Vol. 95, No. 14*.
- Heinegard, D., Tiderstrom, G. (1973). Determination of serum creatinine by a direct colorimetric method. *Clinical Chemistry Acta* 43:305
- Hertz-Piccioto, I., Smith, A., Holtzman, D., Lipsett, M. y Alexeeff, G. (1992). Synergism between occupational arsenic exposure and smoking in the induction of lung cancer. *Epidemiology*, 3(1): 23-31.
- Heudorf U., Angerer J. (2001). Urinary monohydroxylated phenanthrene and hydroxypyrene: the effect of smoking habits and changes induced by smoking on monooxygenase-mediated metabolism. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 74(3): 177-83

- Hirvönen A., Husgafvel-Pusiainen K., Karjalainen A., Sorsa M y Vainio H. (1992). Point mutational Msp1 and ile-val polymorphism closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 485-489.
- Ho Soon, M., Kang, W.K., Ho Lee, C. y Kim, S.G. (2001). Potentiation of arsenic-induced cytotoxicity by sulfur amino acid deprivation (SAAD) through activation of ERK1/2, p38 kinase and JNK1: the distinct role of JNK in SAAD-potentiates mercury toxicity. *Toxicology Letters*. 121:1:45-55
- Ho, P., Saville, D., Wanwimolruk S. (2001). Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Journal of Pharmaceutical Science* 4(3):217-27
- Hong, Y.C., Leem, J.H., Park, H.S., Lee, K.H., Lee, S.J., Lee, C.K., Kang, D. (1999). Variations in urinary 1-hydroxypyrene glucuronide in relation to smoking and the modification effects of GSTM1 and GSTT1. *Toxicology Letters* 108(2-3):217-23.
- IARC. Some metals and metallic compounds (1980). (IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man, vol. 23). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.
- IARC. (1983). Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1. Chemical Environmental and Experimental Data, IARC Monographs 32. International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp.33-68.
- IARC (1987). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: overall evaluations of carcinogenicity. An updating of IARC monographs volumes 1 to 42. (Suppl 7). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer:100-6.
- IARC (2002) [en línea] <<http://193.51.164.11/monoeval/grlist.html>> IARC Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Consulta realizada el 22 de abril de 2002
- Instituto Nacional de Estadísticas (INE). (2002). Indicadores de población nacional 1990-2005, en <<http://www.ine.cl>>. Consulta realizada el 16 de mayo de 2002
- Ioannides, C. y Parke, D. (1993). Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews* 25: 485-501
- Irrázabal, C., Rojas, C., Aracena, R., Márquez, C., Gil, L. (2001). Chilean pilot study on the risk of lung cancer associated with codon 72 polymorphism in the gene of protein p53. *Enviado a publicación, diciembre 2001*
- Ishikawa, T. (1992). The ATP glutathione dependent S-conjugate export pump. *Trends in Biochemical Sciences* 17(1): 463-468.

- Jerina, D.M., Chadha, A., Cheh, A.M., Schurdak, M.E., Wood, A.W., y Sayer, J.M. (1990). Covalent binding of bay-region of diol-epoxides to nucleic acids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 283: 533-553.
- Jongeneelen F., RBM Anzion, Ch., Leijdekkers, R., Bos y Henderson, P. (1985). 1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 57:47-55.
- Jongeneelen F, vd Akker W., Bos R., Anzion R., Theuws J., Roelofs H., Henderson P. (1988). 1-hydroxypyrene as an indicator of the mutagenicity of coal tar after activation with human liver preparations. *Mutation Research*, 204:203-206.
- Jongeneelen, F. J., van Leeuwen, F. E.Oosterink, S. Anzion RB, van der Loop F, Bos RP, van Veen HG. (1990) Ambient and biological monitoring of cokeoven workers; determinants of the internal dose of PAH. *British Journal of Industrial Medicine* 47, 454-461.
- Jongeneelen, F.J. (2001). Benchmark Guideline for Urinary 1-Hydroxypyrene as Biomarker for Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Annals of Occupational Hygiene*, 45(1), 3-13.
- Justice G. Guerrero R. Rounds R., Ihangiani H., Tchekinedyan N., Shah K., Evans J., Filbeil M. y Bald F. (1992). Ring shaped particle (RSP): A New Tumor Marker More Accurate than Either CA 15-3 or CEA for Monitoring Breast Cancer; *ASCO Proceedings, Volume XI May 17. San Diego, California*.
- Kato, S., Bowman, K.D. y Harrington, A.M. (1995). Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphism in vivo. *Journal of National Cancer Institute* 902-907
- Kawajiri K., Watanabe J., Gotob O., Tagashira Y, Sowaga K. y Fujii-Kuriyama Y (1986). Structure and drug inducibility of the human cytochrome P450c gene. *European Journal of Biochemistry* 159: 219-225.
- Kawajiri K., Nakachi K., Imai K., Yoshii A., Shinoda N. y Watanabe J. (1990). Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphism of the cytochrome P-4501A1 gene. *FEBS Letters*, 263: 131-133.
- Kawajiri, K., Eguchi, H., Nakachi, K., Sekiya, T., Yamamoto, M. (1996) Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Research*, 56(1):72-6
- Keimig, S.D., K.W. Kirby, D.P. Morgan, Keiser JE, Hubert TD. (1983). Identification of 1-hydroxypyrene as a major metabolite of pyrene in pig urine. *Xenobiotica* 13: 415-420.

- König J., Balfanz E., Bechtloff G. (1985). Zusammensetzung von PAH-gemischen an unterschiedlichen Arbeitsplätzen. Bundesanstalt für Arbeitsschutz. Dortmund, FRG. *Report Fb 431*
- Kuljukka, T., Vaaraninta, R., Veidebaum, T., Sorsa, M. y Pelkonen, K. (1996) Exposure to PAH compounds among cokery workers in the oil shale industry. *Environmental Health Perspectives* 104, 539–541.
- Lauwerys, R. R. (1997) *Occupational Toxicology*, 5th edn. Cassett and Doull's *Toxicology*. Pergamon Press, New York (Chapter 29).
- Lesage J, Perrault G, Durand P. (1987). Evaluation of worker exposure to PAH. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 48:753-759.
- Lin, H.J., Han, C.Y., Bernstein, D.A. Hsiao W, Lin BK, Hardy S. (1994). Ethnic distribution of glutathione transferase Mu 1-1 (GSTM1) in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 15 1077-1081.
- Liu, J., Chen, H., Miller, D.S., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., Johnson, D.R., Klaassen, C.D., Waalkes, M.P. (2001). Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Molecular Pharmacology* 60(2):302-9.
- Liu, Y.H., Taylor, J., Linko, P. Lucier GW, Thompson CL. (1991). Glutathione S-transferase μ in human lymphocyte and liver: role in modulating formation of carcinogen-derived DNA adducts. *Carcinogenesis* 12: 2269-2275.
- Luukkanen, L., Mikkola, J., Forsman, T., Taavitsainen, P., Taskinen, J. Y Elovaara, E. (2001). Glucoronidation of 1-hidroxypyrene by human liver microsomes and human UDP-glucoronosyltransferase UGT1A6, UGT1A7, and UGT1A9: Development of a high-sensitivity glucoronidation assay for human tissue. *Drug Metabolism and Disposition* 29, (8): 1096-1101
- Mannervik, B., Alin, P., Guthenberg, C., Jensson, H., Tahir, M.K., Warlhom, M. y Jörnvall, A. (1985). Identification of three clases of glutathione tranferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amwerica* 82, 7202-7206.
- Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M. y Ketterer, B. (1991). Thete, a new class of glutathione s-transferases purified from rat and man. *Biochemistry Journal*, 274: 409-414
- Miller, S.A., Dykes, D.D. y Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16, 1215.
- Ministerio de Salud de Chile (1996). Estadísticas de mortalidad por cáncer.

- Möller L. (1994). In vivo metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives*; 102(4):139-146
- Muller, J., Hawker, D., y Connell, D. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Brisbane, Australia. *Chemosphere*; 37(7):1369-1383
- Muñoz, S., Vollrath, V., Vallejos, M.P., Miquel, J.F., Covarrubias, C., Raddatz, A. y Chianale, J. (1998). Genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics* 8(4):343-51
- Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, I., Watanabe J., Kawajiri K. (1991). Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose, *Cancer Research* 51: 5177-5180.
- Nakamuro K, y Sayato Y. (1981). Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutation Research*, 88(1):73-80
- Nakanishi, Y., Chen S, Inutsuka, S., Ma, Y., Jiang, X., Hara, N., Sera, N. y Tokiwa, H. (1997). Possible role of indoor environmental and coal combustion emission in lung carcinogenesis in Fuyuan County, China. *Neoplasma*; 44(1):69-72
- Nan, H., Kim, H., Lim, H., Choi, J., Kawamoto, T., Kang, J., Lee, C., Kim, Y. y Kwon, E. (2001). Effects of occupation, lifestyle and genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1 and GSTT1 on urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations. *Carcinogenesis* 22(5):787-793.
- Nedelcheva, V. y Gut, I. (1994). P450 in the rat and man: methods of investigation, substrate specificities and relevance to cancer. *Xenobiotica* 24(12):1151-75. Review.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C, y Nerbert D.W. (1996). P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6: 1-42
- Nerbert, D., y Gonzalez, F., (1985). Cytochrome P-450 gene expression and regulation. *Trends in Pharmacological Sciences* 6 160-164
- Nerbert, D., Petersen, D.D., y Puga, A. (1991). Human Ah Locus polymorphism and cancer: inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin. *Pharmacogenetics* 1: 68-78
- Nesnow S., Davis, C., Padgett, W., Adams, L., Yacopucci, M. y King, L (2000). 8,9-Dihydroxy-8,9-dihydrodibenzo[a,l]pyrene is a potent morphological cell-transforming agent in C3H10T^{1/2}C18 mouse embryo fibroblasts in the absence of detectable covalent DNA adducts. *Carcinogenesis* 21(6) 1253-1257

- Ohkita, C., Goto, M. (1990). Increased 6-hydroxycortisol excretion in pregnant women: implication of drug-metabolizing enzyme induction. *DICP* 24(9):814-6.
- Okey A. Riddick D., y Harper, P. (1994). Molecular Biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 15, 226-232
- Olaeta, I. (1991). Métodos de monitoreo de la calidad del aire en lña región Metropolitana (Red MACAM). *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias* 7: 186-190
- Ostro, B., Sánchez, J., Aranda., y Eskeland, G. (1996). Air pollution and mortality: Resultas from a study of Santiago, Chile. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 6(1): 97-114.
- Ostro B. y Chestnut L. (1998). Assessing the health benefits of reducing particulate matter air pollution in the United States. *Environmental Research*, 76(2):94-106.
- Overbo, S., Ryberg, D., haugen, A., Leira, H.L. (1998). Glutathione S-transferase M1 and P1 genotypes and urinary excretion of 1-hydroxypyrene in coke oven workers. *The Science of the Total Environment* 220(1) 25-31.
- Peters, A. Wichann HE., Tuch T, Heinrich J y Heyder J (1997). Respiratory effects are asociated with the number of ultrafine particles. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*; 155(4): 1376-1383
- Pope, C., Burnett, R., Thun, M., Calle, E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term expousure to fine particulate air pollution. *Journal of the American Medical Association*, 287(9) 1132-1141
- Quiñones, L., Gil, L. (1995). Induction of rat hepatic P4501A1 by organic extracts from aibone particulate matter in Santiago, Chile. *Xenobiotica* 25: 81-89
- Quiñones, L. (1999). Marcadores genéticos y enzimáticos de suseptibilidad a cáncer pulmonar por exposición a HAPs contaminantes ambientales. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Medicina.114p
- Radabaugh TR, Aposhian HV. (2000). Enzymatic reduction of arsenic compounds in mammalian systems: reduction of arsenate to arsenite by human liver arsenate réductase. *Chemical Research in Toxicology* 13(1):26-30
- Rannug A., Alexandrie A.-K., Persson I., Ingelman-Sundberg M. (1995) Genetic polymorphism of cytochromes P-4501A1, 2D6 and 2E1: Regulation and toxicological significance, *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 37 1729-1731
- Rebbeck, T.R. (1997). Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer sisceptibility. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 6 733-743.

- Registro Nacional del Cáncer (2000), Informe anual
- Rendic, S., Di Carlo, F.J. (1997). Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews* 29:413-580
- Riquelme, R. (2002). Hidrocarburos aromáticos policíclicos y derivados nitrados en material particulado de emisiones diesel. Tesis para optar al título de Ingeniero de Ejecución en Medio Ambiente, Universidad de Santiago de Chile.200p
- Rivara M. I., Cebrian M., Corey G., Hernández M. y Romieu I. (1997). Cancer risk in an arsenic-contaminated area of Chile. *Toxicology and Industrial Health* 13 (2-3): 321-338.
- Rosenkranz, HS. (1996). Mutagenic nitroarenes, diesel emissions, particulate induced mutation and cancer: an assay on cancer causation by a moving target *Mutation Research*; 367(2) 65-72.
- Rushmore, T., King, R., Paulson, K. y Pickett, C. (1990). Regulation of glutathione s-transferase Ya subunit gene expression: Identification of a unic xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by planar aromatics compounds. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the Unites States of America* 87, 3826-3830.
- Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W., Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ. (2000). CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 67:48-56.
- Schoket, B.(1999). " DNA damage in humans exposed to enviromental and dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research* 424 143-153.
- Schoket, B., Papp, G., Levay, K., Mrackova, G., Kadlubar, F.F., Vincze, I. (2001). Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure. *Mutation Research* 482(1-2):57-69
- Schrag ML, Wienkers LC. (2001). Covalent alteration of the CYP3A4 active site: evidence for multiple substrate binding domains. *Archieves of Biochemistry and Biophysics* (1): 49-55.
- Seidegård, J., Vorachek, W. (1988). Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trns-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the Unites States of America* 85 7293-7297.
- Servicio de Salud Metropolitano del Ambiente (2002) [en línea]. Índice de calidad del aire referido a partículas. <http://www.sesma.cl/macam2rm/pag/p00main.htm>. Consulta efectuada el 21 de abril

- Simeonova, P. y Luster, M. (2000). Mechanisms of arsenic carcinogenicity: Genetic or epigenetic mechanisms. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 19(3):281-286
- Sims, P., Grover, P.L., Swaisland, A., Pal, K., y Hewer, A. (1974). Metabolic activation of benzo[a]pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature* 252, 326-328
- Sing R., Tucekm A., Maxa K., Tenglerova J., Weiland E.H. (1995). A rapid and simple method for the analysis of 1-hydroxypyrene glucuronida: a potential biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbons exposure. *Carcinogenesis* 16(12): 2909-2915.
- Smith A.H., Goicolea M., Haque R. y Biggs M.L. (1998). Marked increased in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due arsenic in drinking water. *American Journal of Epidemiology*, 147: 660-669.
- Strickland P., Kang D., Sithisarankul P. (1996). Polycyclic aromatics hydrocarbons metabolites in urine as biomarkers of exposure and effect. *Environmental Health Perspectives* 104: 927-932.
- Swanson, H. Y Bradfield, C.A. (1993). " The Ah-receptor: genetics, structure and function" *Pharmacogenetics*, 3, 213-230.
- Taningher, M., Malacarne, D., Izzotti, A., Ugolini, D. Y Parodi, S. (1999). Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutation Research* 436: 227-261.
- Tefré T., Ryberg D., Haugen A., Nebert DW, Skaug V, Brogger A, Borresen AL. (1991). Human CYP1a1 (cytochrome P₁450) gene: lack of association between the Msp1 restriction fragment lenght polymorphism and incidence of lun cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics* 1:20-25
- Thomas DJ, Styblo M, Lin S. (2001). The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicology and Applied Pharmacology* 176(2):127-44.
- Thomsen, J., Wang, R., Hines, S., Safe, S. (1994). Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsivness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor. *Carconogenesis* 15 933-937.
- Tietz N.W. (1986). Textbook of clinical Chemistry. WB Saunders, Philadelphia. 1271-1281.
- To-Figueras, J., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Galan, M.C., Fuentes, M., Ramon, J.M., Rodamilans, M., Huguet, E., Corbella, J. (1997). Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis*; 18(8): 1529-33.

- U.S. Public Health Service (1989). Toxicological profile for arsenic. U.S. Public Health Service, Washington D.C. 9-67
- Valenzuela, C. (1984). Marco de Referencia Sociogenético para los Estudios de Salud Pública en Chile. *Revista Chilena de Pediatría*, 55 (2):123-7
- Valenzuela, C., Acuña, M., Harb, Z. (1987). Gradiente Sociogenética en la Población Chilena. *Revista Medica de Chile*, 115:295-299.
- van Delft, J., Steenwinkel, M., van Asten, J., de Vogel N., Bruijntjes-Rozier, T., Schouten, T., Cramers, P., Maas, L., van Herwijnen, M., van Schooten, F., Hopmans, P. (2001). Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Annals of Occupational Hygiene* 45(5):395-408.
- van Poppel, G., de Vogel, N., van Balderen, P.J., Kok FJ. (1992). Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme μ . *Carcinogenesis* 18: 303-305.
- Vakharia, D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q.Y., Kaminsky, L.S.(2001). Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug Metabolism and Disposition* 29(7):999-1006
- Vather, M., Marafante, E., Dencker, L. (1984). Tissue distribution and retention of ^{74}As -dimethyl-arsenic acid in mice and rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 13 259-264
- Viezzer, C., Norppa, H., Clonofero, E., Gabbani, G., Mastrangelo, G., Hirvonen, A., y Celotti, L. (1999). Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and EPHX gene polymorphisms on DNA adduct level after and HPRT mutant frequency in coke oven workers. *Mutation Research* 431, 259-269
- Wells, W., Xu, D., Yang, Y. Y Rocque, P. (1990). Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *Journal of Biological Chemistry* 265 (26): 15361-4
- Westlind A, Löfberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. (1999). Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 59:201-205.
- Whitlock J.P. (1999). Induction of cytochrome P450 1A1. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 39, 103-125.
- Widersten, M., Pearson, W.R., Engström, Å. y Mannervik, B. (1991). Heterologous expression of the allelic variant Mu-class glutathione transferases μ and ψ . *Biochemistry Journal*, 276: 519-524

- World Health Organization. (1981). Arsenic. In: Environmental health criteria. Geneva, Switzerland: World Health Organization 33–49.
- World Health Organization. (1983). International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data. Volume 32. International Agency for Research on Cancer, Printed in the UK. 477 pp.
- World Health Organization. (1987). Air quality guidelines for Europe. Chapter 30. ISBN 9289011149, 426 pp.
- Wu D., Zhou X., Yang G., Xie Y., Hu M., Wu Z., Yang G., Lu., M. (1998). Clinical performance of the AMDL DR70 immunoassay kit for cancer detection. *Journal of Immunoassay* 19(1): 63-72.
- Xiaoyan, C., Mass, M. (2001). Both hypomethylation and hypermethylation of DNA associated with arsenic exposure cultures of human cells identified by methylation-sensitive arbitrary-primed PCR. *Toxicology Letters* 122:3:223-234.
- Zakharyan RA, Sampayo-Reyes A, Healy SM, Tsapralis G, Board PG, Liebler DC, Aposhian HV. (2001). Human monomethylarsonic acid (mma(V)) reductase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *Chemical Research Toxicology*. 14(8):1051-7
- Zhao, C.Q., Young, M.R., Diwan, B.A., Coogan, T.P. y Waalkes, M.P. (1997). Association of arsenic-induced malignant transformant with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:10907-10912
- Zheng W, Jin F, Dunning LA, Shu XO, Dai Q, Wen WQ, Gao YT, Holtzman JL. (2001). Epidemiological study of urinary 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratios and breast cancer risk. *Cancer Epidemiology and Biomarkers Prevention*, 10.
- Zhiri A, Wellman-Bednawska M, Siest G. (1987). Le 6-b -hydroxycortisol : un reflet non invasif des enzymes du métabolisme des médicaments. *Pathologie et Biologie* 35:1087-1093.

ANEXOS

ANEXO N°1 CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Colaboración en una investigación para evaluar factores ambientales que afectan a la salud humana

Antofagasta,----- de ----- de 2---

Estimado Sr.

Nos dirigimos a Ud. con el propósito de solicitar su colaboración para realizar un estudio sobre: **Agente Cancerígenos y Cáncer en la II Región**. Es nuestro interés investigar el efecto que tienen contaminantes ambientales en la salud humana, con el objeto de obtener información para prevenir a las personas del riesgo por exposición a este tipo de compuestos.

En este estudio se comparará personas que residen en áreas rurales y urbanas, con personas expuestas en un ambiente laboral.

Le solicitamos a Ud. una donación voluntaria de una muestra sanguínea de aproximadamente 30 ml, la cual se extraerá con un sistema estéril y en condiciones higiénicas óptimas, por personal especializado.

Como parte del estudio llenaremos una ficha clínica que incluya sus datos de: identificación personal, historia médica y de su familia, consumo de fármacos, alcohol, café, cigarrillos y posible exposición a contaminantes ambientales, en espacios interiores, exteriores y/o laborales.

La información de la ficha y los resultados obtenidos en este estudio son confidenciales y recibirá el resultado de sus exámenes con una evaluación de sus riesgos, una vez terminado el estudio.

En caso que Ud. esté siendo tratado por algún médico, si Ud. lo desea, la información puede ser remitida directamente a este profesional.

Por ser la toma de muestra de carácter rutinario y muy controlada, no presenta mayores riesgos para Ud. El único riesgo posible podría ser la aparición de un pequeño hematoma.

Declaro conocer los términos de la solicitud de una muestra sanguínea, para el estudio aquí indicado y autorizo voluntariamente la toma y procesamiento de estas muestras.

Nombre:

RUT:

Firma:

Gracias por su colaboración

ANEXO N° 2: ENCUESTA

**ENCUESTA SOBRE SIGNOS Y SINTOMAS RESPIRATORIOS PARA TRABAJADORES DE
EXPUESTOS A EMISIONES DIESEL EN LA CIUDAD DE SANTIAGO Y CURACAVI.**

**LEA CUIDADOSAMENTE CADA PREGUNTA Y RESPONDA LO MAS EXACTO Y
FRANCAMENTE POSIBLE.
TODA LA INFORMACION RECOPIADA SERA DE CARACTER CONFIDENCIAL.**

- NOMBRE DE LA PERSONA QUE COMPLETO EL CUESTIONARIO:

- FECHA EN QUE SE COMPLETO EL CUESTIONARIO

¿ES USTED CHILENO? Sí _____ No _____

A) DATOS PERSONALES DEL ENCUESTADO(A)

NOMBRE _____

DIRECCION _____

1.- Sexo: Hombre _____ Mujer _____

2.- Edad _____ años

3.- Ciudad donde vive actualmente
Santiago _____ Comuna _____
Curacaví _____

4.- ¿Cuántos años lleva viviendo en esta ciudad?
_____ años

5.- ¿Cuántos años lleva viviendo en esta comuna?
_____ años

6.- ¿En qué ciudad vivía anteriormente? ¿Cuántos años?
_____ años

B) PREGUNTAS SOBRE LA VIVIENDA

7.- Material del piso de la casa en la que habita

1 Madera _____

2 Ladrillo _____

3 Concreto _____

4 Tierra _____

5 Sintético (Flexit, Vinil, etc) _____

6 Otro _____

8.- Cubierta de murallas de la casa que habita

1 Pintura _____

2 Papel _____

3 Barniz _____

4 Cartón _____

5 Otro _____

6 Nada _____

9.- ¿Usa algún tipo de calefacción en su hogar?

Si _____ No _____

10.-¿Qué tipo de combustible usa para su calefacción?

1 Leña _____

2 Carbón _____

3 Parafina _____

4 Gas _____

5 Estufa eléctrica _____

6 Otro sistema _____

11.-¿Qué tipo de combustible usa para cocinar?

1 Leña _____

2 Carbón _____

3 Parafina _____

4 Gas _____

5 Estufa eléctrica _____

6 Otro sistema _____

12.-¿Son pavimentadas las calles que circundan su casa?

Si _____

No _____

13.-¿Vive usted cerca de algún tipo de fábrica contaminante?

Si _____

No _____

C) Las preguntas que vienen a continuación corresponden principalmente a síntomas y signos respiratorios.

TOS:

14.-¿Cuando usted está resfriado presenta tos?

Si _____

No _____

15.-Sin estar resfriado ¿Usted presenta tos ?

Si _____

No _____

16.-¿En qué momento del día presenta la tos?

Al levantarse _____

Durante la tarde _____

Todo el día _____

Durante la mañana _____

Durante la noche _____

17.-¿En qué meses tiene (le viene) la tos?

Ene _____

Feb _____

Mar _____

Abr _____

May _____

Jun _____

Jul _____

Ago _____

Sep _____

Oct _____

Nov _____

Dic _____

CONGESTION Y/O FLEMAS

18.-Cuando usted está resfriado ¿ Usted presenta el pecho congestionado y/o con presencia de flemas ?

Si ___ No ___

19.-No estando resfriado ¿ Usted presenta el pecho congestionado y/o con presencia de flemas ?

Si ___ No ___

20.-¿Cuántas veces al día tiene espectoración?

Al levantarse _____ Durante el día _____ Todo el día _____
Durante la mañana _____ Durante la noche _____ Nunca _____

21.-¿En qué meses tiene espectoración?

Ene ___ Feb ___ Mar ___ Abr ___ May ___ Jun ___
Jul ___ Ago ___ Sep ___ Oct ___ Nov ___ Dic ___
Nunca ___

DIFICULTAD RESPIRATORIA

22.-¿En qué época del año usted presenta más problemas respiratorios?

1 Verano _____ 2 Otoño _____ 3 Invierno _____
4 Primavera _____ 5 Todo el año _____

23.-¿Usted presenta problemas respiratorios cuando realiza ejercicios físicos?

Si ___ No ___

24.-¿Alguna vez ha sentido que le silbe el pecho?

Si ___ No ___

25.- ¿Por cuántos años ha tenido estos silbidos? _____ años

26.-¿Ha necesitado tratamiento médico para estos ataques alguna vez?

Si ___ No ___

RESFRIOS:

27.-¿Cuántas veces se resfría al año?

1 vez ___ 2 a 3 veces ___ 4 o más ___ nunca ___

28.-¿Ha tenido alguna vez ataques de estornudos?

Si ___ No ___

29.-Durante los últimos tres años ¿Usted ha tenido alguna enfermedad respiratoria que lo haya distanciado de sus actividades usuales por más de tres días?

Si ___ No ___

D) OTRAS ENFERMEDADES

30.-¿Ha tenido alguna de las siguientes enfermedades?

Bronquitis	Si ___	No ___
Asma	Si ___	No ___
Neumonía	Si ___	No ___
Rinitis(secreción nasal sin resfrío)	Si ___	No ___
Bronquitis crónica	Si ___	No ___
Enfisema	Si ___	No ___
Resecamiento de garganta	Si ___	No ___
Fatiga permanente en el trabajo	Si ___	No ___
Problemas de la voz sin estar resfriado	Si ___	No ___
Ojos enrojecidos	Si ___	No ___

Si usted es o ha sido asmático, responda:

31.-¿A qué edad comenzó su asma? Edad _____

32.-¿Aún tiene asma? Si ___ No ___

33.-¿Toma algún medicamento o realiza algún tratamiento para el asma?

Si ___ No ___

34.-¿Cuál(es)? _____

ALERGIA

35.-¿Le ha diagnosticado alguna vez su doctor alguna reacción alérgica?

Si ___ No ___

Si la respuesta anterior es SI, conteste las siguientes alternativas:

Alimento _____	Medicamento _____	Ambos _____
Polen y/o polvo _____	Detergentes(químicos)_____	Otro _____

CANCER

36.-¿Su doctor le ha dicho alguna vez que tiene cáncer?

Si ___ No ___

Si la respuesta anterior es SI, responda las siguientes preguntas:

37.-¿De que tipo es el cáncer diagnosticado? _____

38.-¿Hace cuánto tiempo le hicieron el diagnóstico? _____

39.-¿Ha recibido algún tipo de tratamiento? ¿Cuál(es)?

Si ____ No ____ _____

40.- ¿Usted tiene actualmente cáncer? ¿De qué tipo?

Si ____ No ____ _____

41.-¿Tiene algún familiar que haya tenido o tenga actualmente cáncer?

Si ____ No ____

Si la respuesta a la pregunta anterior es SI, conteste las siguientes alternativas:

Padre	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Madre	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Abuelo paterno	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Abuela paterna	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Abuelo materno	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Abuela materna	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Tíos	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Hermanos	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____
Hijos	Si ____	No ____	Tipo de cáncer _____

E) PREGUNTAS SOBRE HABITO DE CONSUMO DE TABACO

42.-¿Ha fumado alguna vez más de 1 cigarrillo al día durante 1 año?

Si ____ No ____

43.-¿Usted fuma actualmente? Si ____ No ____

44.-¿Cuántos cigarrillos al día fuma usted en la actualidad?

_____ cig/día

45.-¿A qué edad comenzó a fumar regularmente? _____ años

46.-¿Cuántos años lleva fumando? _____ años

47.-¿Dónde fuma?

Al interior de su casa ____ A exterior de su casa ____
En el trabajo ____ Otro lugar ____

48.-Si usted dejó totalmente de fumar ¿Qué edad tenía entonces?

_____ años

49.-Durante las horas laborales en su lugar de trabajo ¿Se fuma?

Si ____ No ____

50.-En su hogar ¿Se fuma ?

Si ____ No ____

F) PREGUNTAS ACERCA DE SU ACTIVIDAD LABORAL:

51.-¿Cuál es la actividad que realiza actualmente?

52.-¿Hace aproximadamente cuánto tiempo que realiza esta labor en este lugar?

53.-¿Cuántas horas al día trabaja en este lugar?

_____ horas

54.-¿Cuántos días a la semana trabaja en este lugar?

_____ días

55.-¿Desempeña usted algún otro trabajo en este momento?

Si ____ No ____ ¿Dónde? _____

56.-¿Ha desempeñado algún trabajo anterior al que tiene actualmente?

Si ____ No ____

57.-¿En qué área usted trabajaba anteriormente?

Igual a la anterior ____ Agricultura ____ Minería ____ Pesca ____
Comercio ____ Otra _____

58.-¿Por cuánto tiempo?