



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias

Programa de Doctorado "Investigación en Cáncer"

"Polimorfismos en genes metabolizadores del
alcohol, acetaldehído y folato y riesgo de cáncer
de pulmón"

Sara María Álvarez Avellón
16 de Septiembre de 2015

TESIS DOCTORAL



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del
Principado de Asturias

Programa de Doctorado "Investigación en Cáncer"

Tesis Doctoral

"Polimorfismos en genes metabolizadores del
alcohol, acetaldehído y folato y riesgo de cáncer
de pulmón"

Sara María Álvarez Avellón

Adonina Tardón García



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Polimorfismos en genes metabolizadores del alcohol, acetaldehído y folato y riesgo de cáncer de pulmón	Inglés: Polymorphisms in genes involved in alcohol, acetaldehyde and folate metabolism and lung cancer risk
2.- Autor	
Nombre: Sara M ^a Álvarez Avellón	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en Cáncer (Mención de Calidad)	
Órgano responsable: Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)	

RESUMEN (en español)

En 1988, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) concluyó que “hay suficientes evidencias de que las bebidas alcohólicas son cancerígenas en los seres humanos” por ello, el principal objetivo de esta tesis ha sido determinar la posible asociación entre polimorfismos presentes en genes implicados en el metabolismo del alcohol (*ADH*, *CYP2E1*), el acetaldehído (*ALDH*) y el folato (*MTHFR*) con el riesgo de cáncer de pulmón, así como la posible asociación entre el alcohol y el cáncer de pulmón, las interacciones gen-gen y gen-ambiente. Los polimorfismos en estos genes pueden dar lugar a modificaciones en la actividad de la enzima que codifican, lo cual lleva a diferentes exposiciones al acetaldehído, clasificado como carcinógeno en humanos por la IARC, y por ello, a diferencias en la susceptibilidad individual en el desarrollo de cáncer de pulmón. El presente trabajo forma parte de otro estudio más amplio, denominado estudio CAPUA (Cáncer de Pulmón en Asturias) que incluye un total de 1039 casos y 939 controles. Nuestros resultados indican que un consumo de alcohol entre 0,1-9,9 g/día parece ejercer un efecto protector a desarrollar cáncer de pulmón. Sin embargo, un consumo de alcohol ≥ 30 g/día parece aumentar el riesgo de cáncer de pulmón. Por otro lado, un elevado consumo de frutas y verduras parece neutralizar parte del efecto dañino causado por el alcohol. También hemos encontrado un efecto sinérgico entre el alcohol y el tabaco, de forma que el riesgo de cáncer de pulmón aumenta en 14 veces para individuos que son grandes bebedores y grandes fumadores. Tanto el alelo salvaje Ile del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* como el alelo variante His del polimorfismo Arg48His del gen *ADH1B*, ambos asociados con una mayor velocidad de oxidación de alcohol a acetaldehído, así como el alelo variante c2 del polimorfismo *RsaI* y el alelo variante C del polimorfismo *DraI*, ambos presentes en el gen *CYP2E1* y asociados con una mayor actividad transcripcional y una mayor actividad catalítica de la enzima, aumentan el riesgo de cáncer de pulmón cuando el consumo de alcohol es alto o moderado. Por otro lado, el alcohol es un antagonista del folato, el cual está implicado en eventos como la metilación y síntesis de ADN, por lo que la actividad *MTHFR* y la disponibilidad de folato podrían afectar a la expresión genética (a través de la metilación del ADN) y a la integridad genómica (a través de la síntesis y reparación del ADN). En nuestros resultados observamos que el alelo variante T del polimorfismo C677T del gen *MTHFR*, comúnmente llamado termolábil ya que la actividad de la enzima codificada se reduce en un 50-60% a 37°C, parece estar asociado con un mayor riesgo de cáncer de pulmón. También observamos un aumento del riesgo asociado al genotipo homocigoto variante T/T cuando el consumo de alcohol es ≥ 30 g/día. Sin embargo, cuando el consumo de folato es moderado o alto el genotipo homocigoto variante T/T está asociado con un menor riesgo de cáncer de pulmón. El polimorfismo C677T de la *MTHFR* es posiblemente el único polimorfismo génico conocido que pasa de ser un factor de riesgo a un factor protector en función del estado de los nutrientes. En



nuestros resultados observamos una interacción entre los genes *ADH1B* (alelo His48) y *MTHFR* (alelo C677), *ADH1B* (alelo His48) y *CYP2E1* (alelo c1 *RsaI*), *ADH1C* (alelo Ile349) y *CYP2E1* (alelo D *DraI*), y *MTHFR* (alelo C677) y *CYP2E1* (alelo c2 *RsaI*), todas ellas disminuyen el riesgo de cáncer de pulmón.

En conclusión, tanto el alcohol como polimorfismos en genes que participan en el metabolismo del alcohol, acetaldehído y folato parecen estar implicados en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón.

RESUMEN (en Inglés)

In 1988, the International Agency for Research on Cancer (IARC) concluded that “there are enough evidences that alcoholic beverages are carcinogenic in humans”. Thus, the main objective of this thesis was to determine the possible association between polymorphisms in genes involved in alcohol (*ADH*, *CYP2E1*), acetaldehyde (*ALDH*) and folate (*MTHFR*) metabolism with lung cancer risk, and the possible association between alcohol and lung cancer, gene-gene and gene-environment interactions. Polymorphisms in these genes may lead to changes in the activity of the enzyme encoding, leading to different exposures to acetaldehyde, classified as “carcinogenic to humans” by the IARC, and therefore to differences in individual susceptibility to develop lung cancer. This work is part of a larger study, called the CAPUA study (Lung Cancer in Asturias) including a total of 1039 cases and 939 controls. Our results indicate that alcohol consumption between 0.1 to 9.9 g/day seems to exert a protective effect to develop lung cancer. However, alcohol consumption of ≥ 30 g/day appears to increase lung cancer risk. On the other hand, a high consumption of fruits and vegetables seems to neutralize some of the harmful effects caused by alcohol. We have also found a synergistic effect between alcohol and tobacco, so that lung cancer risk was 14 times higher for individuals who are heavy drinkers and heavy smokers. Both, the wild allele Ile of Ile349Val polymorphism in the *ADH1C* gene as variant His allele of Arg48His polymorphism in the *ADH1B* gene, both associated with a greater rate of oxidation of alcohol to acetaldehyde, as well as the variant allele c2 of *RsaI* polymorphism and the variant allele C of *DraI* polymorphism, both present in the *CYP2E1* gene and associated with increased transcriptional activity and enhanced catalytic activity of the enzyme, increase lung cancer risk with moderate or heavy alcohol consumption. On the other hand, alcohol is a folate antagonist, which is involved in events such as DNA synthesis and methylation, so the *MTHFR* activity and folate availability could affect gene expression (by DNA methylation) and genomic integrity (by DNA synthesis and repair). We have observed that the variant allele T of C677T polymorphism in the *MTHFR* gene, commonly called thermolabile as the activity of the encoded enzyme is reduced by 50-60% at 37°C, seems to be associated with a higher lung cancer risk. We also observed an increased risk associated with the homozygous variant genotype T/T when alcohol consumption is ≥ 30 g/day. However, when folate intake is moderate or high, homozygous variant genotype T/T is associated with a lower lung cancer risk. C677T polymorphism of *MTHFR* is possibly the only known gene polymorphism that switches from being a risk factor to a protective one depending on nutrient status. Our results show an interaction between *ADH1B* (His48 allele) and *MTHFR* (C677 allele), *ADH1B* (His48 allele) and *CYP2E1* (c1 *RsaI* allele), *ADH1C* (Ile349 allele) and *CYP2E1* (D *DraI* allele) and lastly *MTHFR* (C677 allele) and *CYP2E1* (c2 *RsaI* allele) genes, all of which reduce lung cancer risk.

In conclusion, genes involved in alcohol, acetaldehyde and folate metabolism seem to be involved in susceptibility to developing lung cancer.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis doctoral:

A la Dra. Adonina Tardón García, por darme la oportunidad de entrar en su grupo de investigación y dirigir y orientar este trabajo.

Al Dr. Jesús Vioque López, por su inestimable ayuda y colaboración.

A la Dra. Patricia González Arriaga y la Dra. M^a Felicitas López Cima, por enseñarme como trabajar en un laboratorio, por resolver mis mil y una dudas con toda la paciencia del mundo, por compartir todos sus conocimientos y por sus sabios consejos. Por su incondicional ayuda, por hacer todo esto más fácil y divertido, y por permitirme conocer las personas que hay tras las batas.

Al Centro Nacional de Genotipado CeGen-ISCIll (www.cegen.org) (Nodo Santiago), por habernos proporcionado los servicios de genotipado.

A todo el personal de las Unidades de Neumología por la colaboración y el tiempo prestado y en especial a:

Dra. Teresa Pacual

Dr. Manuel García Marrón

A todos los pacientes y familiares que tan amable y desinteresadamente han participado en el estudio CAPUA.

A Ana, por ser más que una compañera de laboratorio, por ser mi pilar dentro del 2.19, por calmar mi estrés y hacerme sonreír en los momentos duros .

A Ana Samoano por su trabajo y ayuda con la estadística, y por los buenos ratos en su compañía.

A Cristina, por sus entrevistas, por las muestras y por los ratos del café.

A mis padres y mi hermana, por apoyarme incondicionalmente y animarme con cada meta que me propongo, por llevarme siempre por el buen camino y enseñarme que con esfuerzo todo se puede conseguir. Gracias a vosotros soy la persona en que me he convertido, estaré siempre agradecida por todo lo que hacéis por mí.

A Gus, por hacerme sonreír cada mañana, por entenderme mejor que nadie, por hacerme sentir que puedo conseguirlo, por seguir a mi lado a pesar de mis "neuras" y agobios. Por darme todo su cariño y apoyo sin pedir nada a cambio.

ABREVIATURAS

ADH: Alcohol deshidrogenasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALDH: Aldehído deshidrogenasa

CYP2E1: Citocromo P4502E1

Da: Dalton

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HNPCC: Cáncer Colorrectal hereditario de tipo no polipósico

HPRT1: Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa

IARC: Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer

IC: intervalo de confianza

IDC: Impreso de datos clínicos

KDa: Kilo Dalton

min: minutos

ml: mililitros

mM: milimolar

MTHFR: 5,10-Metilentetrahidrofolato reductasa

NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido

OR: Odds Ratio, relación de las probabilidades

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PY: Paquetes/año

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

WHO: Organización mundial de la salud

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	CÁNCER DE PULMÓN.....	3
1.1.1	Clasificación histológica del cáncer de pulmón.....	9
1.2	FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	10
1.2.1	Bases moleculares del cáncer de pulmón.....	12
1.3	ALCOHOL Y CÁNCER DE PULMÓN.....	14
1.3.1	Metabolismo del Alcohol.....	16
1.3.2	Mecanismos y efectos del alcohol y el acetaldehído.....	17
1.4	SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL: POLIMORFISMOS Y CÁNCER DE PULMÓN.....	22
1.4.1	Polimorfismos de un único nucleótido (SNPs).....	22
1.5	POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN ENZIMAS METABOLIZADORAS DEL ALCOHOL.....	25
1.5.1	Enzima Alcohol deshidrogenasa (ADH).....	25
1.5.1.1	Polimorfismos en el gen <i>ADH1B</i> o <i>ADH2</i>	27
1.5.1.2	Polimorfismos en el gen <i>ADH1C</i> o <i>ADH3</i>	28
1.5.2	Enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH).....	29
1.5.2.1	Polimorfismos en el gen <i>ALDH2</i>	29

1.5.3	Sistema Microsomal de Oxidación de Etanol (MEOS - “Microsomal ethanol oxidizing system”).....	30
1.5.3.1	Polimorfismos en el gen <i>CYP2E1</i>	32
1.6	METABOLISMO DEL FOLATO.....	33
1.6.1	Polimorfismos en el gen <i>MTHFR</i>	35
2	OBJETIVOS	37
3	MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1	MATERIAL.....	43
3.1.1	Reactivos.....	43
3.1.2	Muestras biológicas.....	43
3.2	MÉTODOS.....	44
3.2.1	Diseño del estudio.....	44
3.2.1.1	Sujetos de estudio.....	44
3.2.1.2	Datos sociodemográficos y factores de riesgo.....	45
3.2.1.3	Datos clínicos.....	46
3.2.1.4	Tamaño de la muestra y poder estadístico del estudio.....	46
3.2.1.5	Dieta.....	47
3.2.1.6	Tabaco.....	48
3.2.2	Análisis estadístico.....	48
3.2.3	Biología molecular.....	50
3.2.3.1	Extracción de ADN genómico.....	50
3.2.3.2	Genotipado de SNPs mediante la tecnología Sequenom MassArray (iPLEX GOLD).....	51

4	RESULTADOS.....	61
4.1	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN.....	63
4.2	ANÁLISIS DE ALCOHOL Y CÁNCER DE PULMÓN.....	67
4.3	ANÁLISIS DE INTERACCIONES.....	67
4.3.1	Análisis de interacción alcohol-tabaco.....	67
4.3.2	Análisis de interacción alcohol-verduras.....	68
4.3.3	Análisis de interacción alcohol-frutas.....	68
4.4	ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS Arg48His Y Arg370Cys EN EL GEN <i>ADH1B</i>	69
4.4.1	Análisis estratificado del polimorfismo Arg48His en el gen <i>ADH1B</i>	71
4.4.2	Análisis estratificado del polimorfismo Arg370Cys en el gen <i>ADH1B</i>	73
4.5	ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Ile349Val EN EL GEN <i>ADH1C</i>	75
4.5.1	Análisis estratificado del polimorfismo Ile349Val en el gen <i>ADH1C</i>	76
4.6	ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Glu504Lys EN EL GEN <i>ALDH2</i>	78
4.7	ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS <i>TaqI</i> , <i>RsaI</i> Y <i>DraI</i> EN EL GEN <i>CYP2E1</i>	79
4.7.1	Análisis estratificado de los polimorfismos <i>TaqI</i> en el gen <i>CYP2E1</i>	82
4.7.2	Análisis estratificado de los polimorfismos <i>RsaI</i> en el gen <i>CYP2E1</i>	83
4.7.3	Análisis estratificado de los polimorfismos <i>DraI</i> en el gen <i>CYP2E1</i>	85
4.8	ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO C677T EN EL GEN <i>MTHFR</i>	86

4.8.1	Análisis de folato y cáncer de pulmón.....	87
4.8.2	Análisis de folato, el polimorfismo C677T del gen MTHFR y cáncer de pulmón.....	88
4.8.3	Análisis de alcohol, folato, el polimorfismo C677T del gen MTHFR y cáncer de pulmón.....	89
4.8.4	Análisis estratificado del polimorfismo C677T en el gen MTHFR.....	91
4.9	ANÁLISIS DE LIGAMIENTO.....	93
4.9.1	Interacción Gen-Gen.....	94
5	DISCUSIÓN.....	103
6	CONCLUSIONES.....	131
7	BIBLIOGRAFÍA.....	135
8	ANEXOS.....	173
	ANEXO I: Listado de diagnósticos para los controles.....	175
	ANEXO II: Consentimiento informado.....	187
	ANEXO III: IDC (Impreso de datos clínicos).....	189
	ANEXO IV: Cuestionario de dieta CAPUA.....	193
	ANEXO V: FFQ (Cuestionario semicuantitativo de frecuencia de alimento).....	211

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y su incidencia ha ido en aumento durante el pasado siglo. De acuerdo con las estimaciones del 2011 de la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO), el cáncer causa ahora más muertes que todas las enfermedades coronarias o todos los accidentes cerebrovasculares. En 2012 se estimaron a nivel mundial 14,1 millones de casos nuevos de cáncer y 8,2 millones de muertes por cáncer. Más del 70% de todas las muertes por cáncer se producen en países de ingresos medios y bajos que tienen pocos o ningún recurso para la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer. Las transiciones demográficas y epidemiológicas globales continuas señalan una carga de cáncer cada vez mayor en las próximas décadas, particularmente en los países de medios y bajos recursos. En 2025 se esperan más de 20 millones de casos nuevos de cáncer (Ferlay y col., 2015; Torre y col., 2015).

Con más de 3 millones de casos nuevos y 1,7 millones de muertes cada año, el cáncer es la segunda causa más importante de muerte y morbilidad en Europa, causando el 20% de las muertes, después de las enfermedades cardiovasculares. El cáncer es, en muchos casos, evitable y la detección temprana aumenta considerablemente la probabilidad de curación (Globocan, 2012).

Debido a su alto grado de incidencia y a la elevada tasa de mortalidad, el cáncer de pulmón constituye una de las patologías que mayor interés ha suscitado en las últimas décadas, siendo el cáncer más común en el mundo desde 1985, tanto en términos de incidencia como de mortalidad debido a la alta letalidad de este tipo de tumor. En 2012 hubo 1,8 millones de casos nuevos de cáncer de pulmón (12,9% del total de casos nuevos de cáncer) y 1,6 millones de muertes (19,4% del total de muertes por cáncer) a nivel mundial, siendo responsable de casi una de cada cinco muertes por cáncer. Debido a la alta mortalidad asociada con la enfermedad, los patrones geográficos de mortalidad siguen de cerca los de incidencia. De los 1,8 millones de nuevos casos estimados en 2012, el 58% se produjeron en las regiones menos desarrolladas. El cáncer de pulmón es el cáncer más común en los hombres a nivel mundial (1,2 millones, 16,7% del total), con las mayores tasas en Europa central y Europa del Este (53,5 por 100.000) y Asia oriental (50,4 por 100.000). Por otro lado, las tasas de incidencia son muy bajas en África central y occidental (2,0 y 1,7 por 100.000, respectivamente). Las tasas de incidencia en mujeres

son, por lo general, más bajas y el patrón geográfico es algo diferente, lo que refleja, en parte, las variaciones en el consumo y absorción de tabaco. Las tasas más elevadas se dan en América del Norte (33,8 por 100.000) y en Europa del Norte (23,7 por 100.000) en comparación con las bajas tasas en África central y occidental (Figura 1) (Ferlay y col., 2015; Torre y col., 2015).

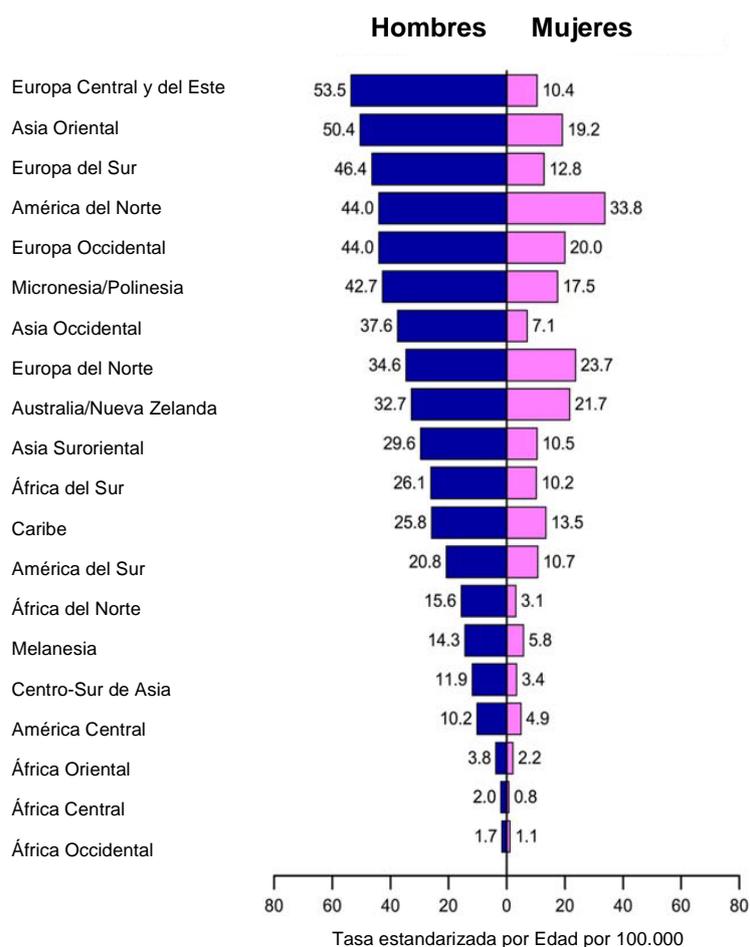


Figura 1: Tasas de incidencia de cáncer de pulmón por sexo y área mundial (Torre y col., 2015)

En 2012 se estimaron 215.534 casos nuevos de cáncer en España, siendo alrededor de 2/3 partes en pacientes ≥ 65 años, con una tasa estandarizada por edad de 215,5 casos por 100.000 habitantes por año, y un riesgo del 25,1% de presentar cáncer antes de los 75 años. La predicción para 2015 es de 227.076 casos, con un crecimiento de nuevos casos que se produce en mayor medida a costa de la población ≥ 65 años. El crecimiento de la población y su envejecimiento explicarían fundamentalmente este incremento. En 2012 hubo 102.762 muertes por cáncer en España, siendo 3/4 partes en personas ≥ 65 años, con una tasa estandarizada por edad de 98,1 casos por 100.000

habitantes por año, y un riesgo de fallecer por cáncer antes de los 75 años del 10,2%. La predicción para 2015 es de 108.390 muertes por cáncer, con un crecimiento mayor para la población \geq 65 años (Informe Anual de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2014).

En España el cáncer con una mayor incidencia es el colorrectal (15%), el que produce la mortalidad más alta es el cáncer de pulmón (20,6%), y el que tiene una prevalencia a 5 años más alta es el cáncer de mama (17,9%) (Figura 2) (Informe Anual de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2014). A nivel mundial, el cáncer con mayor incidencia y mortalidad es el de pulmón (13% y 19,4%, respectivamente) y el cáncer de mama es el que presenta la mayor prevalencia a 5 años (19,2%). Como podemos observar, estos datos son similares a los registrados en nuestro país (Ferlay y col., 2015; Torre y col., 2015).

Si evaluamos por género los datos disponibles para España, observamos que en hombres la incidencia más alta es la del cáncer de próstata (21,7%) y la mortalidad más elevada es la del cáncer de pulmón (27,4%). En mujeres la mayor incidencia y mortalidad es para el cáncer de mama (29% y 15,5% respectivamente) (Informe Anual de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2014).

En 2012, la incidencia de cáncer de pulmón en España fue de 26.715 casos (12,4% del total casos nuevos de cáncer), 21.780 varones y 4.935 mujeres, y se registraron 21.118 muertes por cáncer de pulmón (20,6% del total de muertes por cáncer). Existe una clara diferencia entre géneros en la incidencia de cáncer de pulmón en España, a razón de 4,4 hombres por cada mujer, lo que refleja la incorporación tardía de la mujer al hábito tabáquico. No obstante, esta relación ha ido igualándose debido a que el consumo de tabaco en las mujeres en España ha aumentado considerablemente en las últimas décadas tendiendo a ser igual o mayor que en los hombres (Informe Anual de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2014).

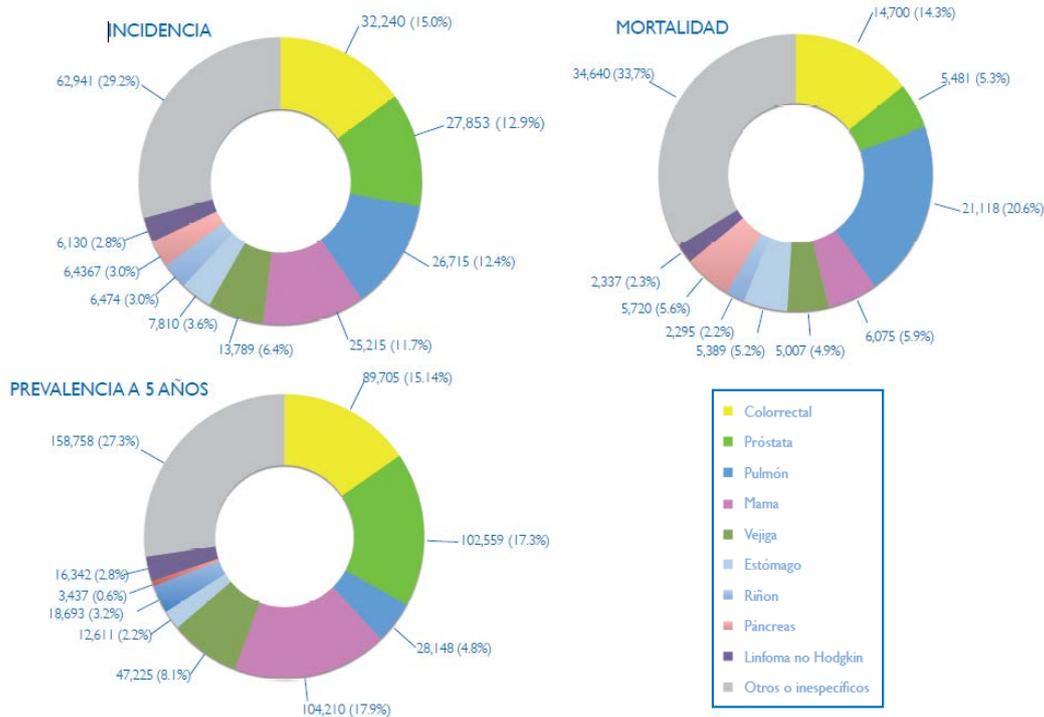


Figura 2: Incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer en España (Informe Anual de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2014)

Hoy se acepta que las diferencias geográficas de presentación del cáncer reflejan de manera predominante los efectos de las diferencias medioambientales y no diferencias raciales. Las causas de estas diferencias geográficas se clasifican en tres grupos. El primer grupo comprende hábitos personales como el tabaco, el consumo de alcohol y la exposición al sol, que son causas bien establecidas de varios cánceres. El segundo grupo comprende causas mucho menos establecidas, relacionadas con la naturaleza de los factores de riesgo del tumor como edad del primer embarazo, diferencias en los hábitos alimentarios y una asociación de factores medioambientales en su sentido más amplio; se observa en las diferencias geográficas de cánceres del tracto intestinal y de los órganos endocrinos dependientes (mama, ovario, útero o próstata). Por último, el tercer grupo corresponde a un número verdaderamente pequeño de cánceres debidos a exposición ocupacional, a fármacos, radiación o factores genéticos y hereditarios. El conocimiento de las tendencias y patrones de incidencia del cáncer en el mundo son la base sobre la que poder evaluar las prioridades de actuación en la prevención del cáncer, ya que la incidencia del cáncer es el parámetro más relevante en el contexto de la prevención, uno de cuyos objetivos es precisamente su disminución (Cueto y col., 2001).

Una característica del cáncer de pulmón que lo diferencia del resto de cánceres es que los factores ambientales contribuyen en un porcentaje muy alto (aproximadamente 95%) en el desarrollo de la enfermedad. Numerosos estudios epidemiológicos han constatado que el tabaco es el principal factor de riesgo externo, con un riesgo relativo del 20-25% y un riesgo atribuible del 85-90% (Baron y col., 1996). Del mismo modo, se ha estimado que el tabaco contribuye a la aparición del 80-90% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y del 55-80% en mujeres (Levi, 1999). Más aún, el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón es entre 15 y 30 veces mayor para un fumador que para un no fumador (IARC, 1986), lo que ratifica la importancia de los factores ambientales en la aparición del cáncer de pulmón.

El hecho de fumar no solo perjudica al propio fumador, sino que también perjudica a los fumadores pasivos, de forma que, un fumador pasivo tiene un riesgo relativo medio de padecer esta enfermedad de 1,25 (IC 95% = 1,15-1,37), según los resultados obtenidos en un meta-análisis que incluía 51 estudios (Boffetta, 2002). La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) ha evaluado formalmente el tabaquismo pasivo involuntario en su programa de monografías, concluyendo que existen suficientes evidencias en humanos de que el tabaquismo pasivo produce cáncer de pulmón y por lo tanto se incluye dentro de los carcinógenos del grupo 1, además de asociarse a síntomas respiratorios crónicos. El exceso de riesgo es del orden del 20% en mujeres y del 30% en hombres, y se mantiene después de controlar por los principales confusores y fuentes de sesgo (IARC, 2004).

El efecto del tabaco en el desarrollo de tumores de pulmón se debe fundamentalmente al elevado número de sustancias tóxicas que contiene el humo del tabaco y a la elevada capacidad de absorción del pulmón. En el humo del tabaco se ha descrito la presencia de más de 60 sustancias que son consideradas carcinógenos por la IARC en base a evidencias epidemiológicas y experimentales (Hecht, 2003) y cuyo mecanismo de actuación va desde la producción de mutaciones en el ADN, al incremento de la generación de radicales libres en las células, la modificación covalente de proteínas o la expresión específica de determinados genes (To i Figueras, 1999; Klaassen y Watkins., 2001; Hecht, 2003).

En este sentido, se ha demostrado que el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón está directamente asociado a la exposición al humo del tabaco (IARC, 1986) y depende

de la duración del hábito tabáquico, de su intensidad (según el número de cigarrillos), de la frecuencia y profundidad de la inhalación, del uso de filtro, así como del tipo de tabaco fumado. Así mismo, el riesgo medio asociado al consumo de tabaco varía de unas poblaciones a otras (OR entre 15 y 30) (Sasco y col., 2004). De esta manera, la exposición individual al humo del tabaco se cuantifica como el número de paquetes de cigarrillos fumados al año, por el número de años que se lleva fumando.

Aunque el tabaco constituye la principal causa de aparición de cáncer de pulmón, existen otros factores de riesgo entre los que podemos destacar las exposiciones ocupacionales, tales como el arsénico, los asbestos, la sílice cristalina o el radón (Neuberger y Field, 2003). Existen además otros factores de riesgo que son los no ocupacionales como la contaminación atmosférica, el consumo de alcohol, una dieta baja en frutas frescas y verduras, que son alimentos ricos en antioxidantes naturales (Donaldson, 2004; Neuhouser, 2004), un nivel bajo de educación (Neuberger y Field, 2003), la susceptibilidad genética individual (Lee y col., 2005; Kang y col., 2006) o el ejercicio físico (Tardon y col., 2005), dado que a través de un meta-análisis se concluye que hay indicios de que la actividad física puede proteger frente a este tipo de tumores. Adicionalmente, el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón aumenta cuando se asocia el humo del tabaco con otras sustancias, como el alcohol o una exposición a otros agentes tóxicos. Así, se ha observado que los grandes fumadores que además son bebedores, tienen un riesgo multiplicado de desarrollar cáncer de pulmón (Levi, 1999), pero también aumenta el riesgo a desarrollar otros cánceres, como el de cavidad oral, faringe, laringe y esófago (IARC, 2004).

1.1.1 Clasificación histológica del cáncer de pulmón

Atendiendo al tipo de célula que origina el tumor, el cáncer de pulmón se clasifica en distintos tipos histológicos, presentando distintas características:

Así, el cáncer de pulmón de células no pequeñas representa casi el 80% del total de los cánceres de pulmón, existiendo tres subtipos. El más frecuente es el carcinoma de células escamosas o epidermoide, que está directamente relacionado con el tabaco y que representa alrededor del 25-30% de todos los casos. Su localización suele ser central, cerca de un bronquio, y raramente es periférico. Su diseminación es sobre todo vía linfática (suele tener afectados ganglios en el momento del diagnóstico) y es el que con

menor frecuencia produce metástasis a distancia, siendo por esto el de mejor pronóstico. El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente en las personas que no fuman. Suele representar el 40% de los casos de cáncer de pulmón y se suele localizar en la región externa del pulmón. En cuanto al pronóstico, este tipo histológico es más metastásico que el epidermoide, aunque menos que el microcítico. El carcinoma indiferenciado o de células grandes representa el 10-15% de los casos de cáncer de pulmón, puede aparecer en cualquier parte del pulmón y tiende a crecer y a extenderse con rapidez, por lo que el pronóstico es malo.

Por otro lado, el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico representa el 15-20% del total de los cánceres de pulmón y está muy relacionado con el hábito de fumar. Es de crecimiento rápido, es altamente invasivo y metastatiza rápidamente por vía hemática, por lo que se le considera el de peor pronóstico.

Se ha comprobado que el tabaco aumenta el riesgo de todos los tipos histológicos del cáncer de pulmón, incluidos el carcinoma de células escamosas (epidermoide), el carcinoma de células pequeñas (microcítico), el adenocarcinoma (tanto bronquial como alveolar) y el carcinoma de células grandes (IARC, 2004).

1.2 FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN LA BIOLOGÍA DEL CÁNCER

El término biológico “cáncer” se aplica genéricamente a más de un centenar de enfermedades diferentes entre las que figuran tumores malignos de distintas localizaciones (mama, cuello uterino, próstata, estómago, colon/recto, pulmón, etc). Cada uno de ellos presenta unas características específicas, que en algunos casos son completamente diferentes al resto de cánceres, pudiendo considerarse enfermedades independientes, con un origen y evolución específica, y por lo tanto, susceptibles de tratamientos específicos. Sin embargo, todas ellas comparten una característica común, que es la alteración de los mecanismos que regulan el crecimiento, la proliferación y la muerte celular. Así, patologías como el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC), el cáncer de mama hereditario o el retinoblastoma hereditario, muestran que la alteración de los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *Rb*, *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *PMS1* y *MSH6*, que dan lugar a estas enfermedades, se asocia con un mal funcionamiento de los mecanismos que controlan el ciclo celular o la reparación del daño genético. La habilidad

de controlar exactamente la ordenación y distribución de los eventos del ciclo celular es esencial para mantener la integridad del genoma y prevenir mutaciones que pueden alterar el control de crecimiento.

La importancia de la inestabilidad genómica en el desarrollo tumoral se pone de manifiesto al estudiar el origen de los cánceres hereditarios, ya que gran parte de ellos se originan por mutaciones en genes que participan en el mantenimiento de la integridad del ADN. Así, uno de los modelos de desarrollo de enfermedad neoplásica mejor conocido es el cáncer de colon hereditario no polipósico (HNPCC). En esta patología, los individuos con una mutación en la línea germinal que afecta a un grupo de genes muy importantes para el mantenimiento de la estabilidad genómica, incluyendo *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *PMS1* y *MSH6* (Strate y Syngal, 2005), se traduce en la aparición de la enfermedad. Estos genes codifican enzimas que participan en la reparación de lesiones espontáneas que se generan durante la replicación del ADN. La existencia de estos mecanismos de detección de daño genético y reparación es especialmente importante en aquellos tejidos en los que hay una división celular activa (epitelios, médula ósea, etc.). La presencia de mutaciones germinales en los genes implicados en la reparación de este tipo de lesiones provoca la acumulación de errores durante la replicación del ADN, lo que facilita la aparición de nuevas mutaciones en genes que participan en el control del crecimiento celular, como los proto-oncogenes y genes supresores de tumores. El resultado de este proceso es la transformación tumoral, que conduce a un crecimiento celular descontrolado y a la formación de un tumor.

El estudio de estos cánceres hereditarios ha permitido profundizar en el conocimiento de los procesos implicados en el desarrollo tumoral. Así, numerosos estudios han revelado que una característica común a las células cancerosas es que presentan un elevado número de mutaciones, que en muchas ocasiones no pueden explicarse únicamente debido a la aparición de mutaciones espontáneas durante la replicación del ADN. Como resultado de este descubrimiento se ha propuesto que las células cancerosas presentan un fenotipo mutador o de inestabilidad genética, es decir, que han adquirido una capacidad anormalmente alta de mutar sus genes. Así, la alteración de los genes de reparación del ADN o de detección de daño genético constituye un mecanismo implicado en las fases más tempranas de la transformación tumoral, lo cual facilita la aparición de células con una gran capacidad de proliferación y altamente invasivas.

Aunque el estudio de los cánceres hereditarios ha permitido conocer algunos de los factores genéticos que contribuyen al desarrollo tumoral, es necesario destacar que menos de un 10% de los casos de cáncer son hereditarios. Estos datos indican que los factores que conducen a la aparición de un cáncer son muy diversos, surgiendo la enfermedad, principalmente, como consecuencia de la interacción entre factores genéticos y exposición a los agentes presentes en el entorno. Determinados hábitos de vida como el consumo del tabaco, la alimentación, el alcohol, la exposición ocupacional o la exposición a factores biológicos o ambientales son fundamentales a la hora de desarrollar determinadas enfermedades como el cáncer. Así, se estima que el 75-80% de los cánceres se deben a la acción de agentes externos que actúan sobre el organismo, causando alteraciones en la célula. La naturaleza de estos agentes es variable, pudiendo distinguirse entre factores químicos, físicos y biológicos. Los carcinógenos químicos están muy relacionados con la actividad industrial. En este sentido, de los 7 millones de compuestos químicos conocidos, en unos 2000 se ha descrito algún tipo de actividad carcinogénica, lo que refuerza la importancia de estos productos en el desarrollo de esta enfermedad. Por otra parte, entre los factores físicos, destacan las radiaciones ionizantes (como los rayos X) y las no ionizantes (como los rayos ultravioleta), las cuáles provocan la aparición de distintos tipos de cáncer en diferentes órganos, como leucemias, cáncer de pulmón o melanomas, entre otros. Por último, los factores biológicos están tomando cada vez más importancia, dado que hoy en día se sabe que el 18% de los cánceres son atribuibles a infecciones persistentes provocadas por virus, bacterias o parásitos, como el virus de papiloma humano (cáncer de cuello uterino), el virus de la hepatitis B (cáncer de hígado) y la bacteria *Helicobacter pylori* (cáncer de estómago).

1.2.1 Bases moleculares del cáncer de pulmón

A diferencia del cáncer de colon, en el que un porcentaje relativamente alto de casos se debe a la presencia de factores genéticos que confieren un riesgo muy elevado de desarrollar este tipo de tumor, en el cáncer de pulmón el mayor factor de riesgo es la exposición al humo del tabaco. Por esta razón, durante las últimas décadas se ha realizado un gran esfuerzo para intentar identificar los compuestos cancerígenos presentes en el humo del tabaco y comprender sus mecanismos de actuación. Actualmente se sabe que los compuestos más potentes son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y las nitrosaminas. Se ha observado que más del 90% de los HAPs inhalados en el humo de tabaco son retenidos en el tracto respiratorio, actuando

fundamentalmente como carcinógenos de contacto, sustancias que se activan metabólicamente formando carcinógenos definitivos. Las nitrosaminas, por su parte, son procarcinógenas y necesitan activación metabólica para producir un carcinógeno definitivo, el alquil diazonio (Solano y Jimenez, 2002).

A nivel molecular, los carcinógenos presentes en el humo del tabaco reaccionan con los ácidos nucleicos formando aductos de ADN. Algunos carcinógenos del tabaco, como el óxido de etileno, el formaldehído o el acetaldehído, pueden reaccionar directamente con el ADN. Sin embargo, la mayoría de los carcinógenos del humo del tabaco necesitan ser metabolizados para convertirse en compuestos tóxicos. La activación metabólica se inicia generalmente a través de enzimas de la familia de los citocromos P450. En el caso de los carcinógenos del tabaco, la oxidación mediada por los citocromos P450 provoca la aparición de especies muy reactivas capaces de reaccionar con el ADN, proteínas u otros componentes celulares, produciendo daños en la célula. En concreto, uno de los derivados de los HAPs del humo del tabaco más estudiados, el benzopireno, no es tóxico cuando se aplica subcutáneamente en modelos animales, sin embargo, una vez absorbido por el organismo es metabolizado por los citocromos P450 y las epóxido hidrolasas, transformándolo en metabolitos altamente reactivos, entre los que destaca el benzopireno-7,8-diol-9,10-epóxido (BDPE). Estos metabolitos electrófilos tienden a unirse covalentemente a zonas nucleófilas del ADN formando aductos, los cuales, si no se corrigen, son capaces de producir mutaciones en genes importantes para el crecimiento celular, incluyendo proto-oncogenes o genes supresores de tumores.

De manera alternativa, gran parte de los metabolitos formados en estas reacciones catalizadas por los citocromos P450 pueden ser inactivados mediante la unión de un grupo glutatión, en una reacción catalizada por enzimas de la familia de las glutatión-S-transferasas (GSTs). Los compuestos conjugados con glutatión pueden ser finalmente eliminados a través de la orina. De esta manera, es razonable pensar que la acumulación de daño genético en una célula va a depender del balance entre la exposición a carcinógenos del humo del tabaco y el funcionamiento de los sistemas de activación/desactivación intracelulares. Más aún, una vez formados los aductos de ADN, existen sistemas de reparación que son capaces de detectar los aductos y corregir el daño genético. Sin embargo, si los aductos de ADN escapan a la reparación y persisten durante la replicación del ADN, puede ocurrir una mutación codificante que conduce a

mutaciones permanentes en la secuencia de ADN. Si las mutaciones ocurren en regiones particulares de genes cruciales, como los oncogenes *RAS* o *MYC*, o los genes supresores de tumores *TP53* o *CDKN2A*, el resultado puede ser la pérdida del control sobre el crecimiento celular normal y el desarrollo de un tumor (To i Figueras, 1999; Martín-Ruíz y col., 2004). En este sentido, el estudio de numerosos casos de cáncer de pulmón ha permitido determinar la existencia de regiones génicas altamente susceptibles a ser mutadas (“hot spots”), provocando la mutación de genes, lo que se ha asociado al inicio de la hiperproliferación y transformación tumoral.

Teniendo en cuenta que las alteraciones en el ADN por compuestos tóxicos o carcinogénicos se asocian a la aparición del cáncer de pulmón, es razonable pensar que los genes que codifican proteínas que intervienen en la activación de procarcinógenos o en el metabolismo de compuestos tóxicos, pueden desempeñar un papel fundamental en la aparición del cáncer, por lo que pequeñas variaciones individuales pueden contribuir a aumentar o disminuir el riesgo a desarrollar un proceso tumoral.

1.3 ALCOHOL Y CÁNCER DE PULMÓN

El tabaco es la mayor causa de cáncer de pulmón, siendo responsable del 75-80% de los casos aproximadamente, pero sólo un 10-15% de los fumadores desarrolla este tumor, lo que sugiere que puede haber otros factores que contribuyen al desarrollo de esta enfermedad, entre los que podríamos destacar el consumo de alcohol, dado que en 1988, la IARC concluyó que “hay suficientes evidencias de que las bebidas alcohólicas son cancerígenas en los seres humanos” (IARC, 1988).

El alcohol es una sustancia cuyo consumo está muy arraigado en la cultura occidental en general, y en la española en particular. Su consumo está aumentando en muchos países como resultado de un aumento tanto de los bebedores como de la ingesta de alcohol, especialmente en mujeres y en las regiones de rápido crecimiento económico tales como el este de Asia (WHO, 1999). Aproximadamente un total de 389000 casos de cáncer a nivel mundial, que representan el 3,6% de todos los cánceres (5,2% en hombres y 1,7% en mujeres), derivan del consumo crónico de alcohol y 232900 muertes, que representan el 3,5% de todas las muertes por cáncer, fueron atribuibles al consumo de alcohol (Rehm y col., 2004; Boffetta y col., 2006).

Aunque solamente el 10-15% de los grandes bebedores desarrolla, por ejemplo, cirrosis hepática y una fracción aún más pequeña de bebedores desarrolla cáncer, el consumo de alcohol aumenta el riesgo de determinados tipos de cáncer (Baan y col., 2007). Actualmente, la IARC ha clasificado los cánceres de cavidad oral, faringe, laringe, esófago, hígado, colorrectal y cáncer de mama en mujeres, como los cánceres de mayor riesgo (Grupo 1) asociados al consumo de alcohol (Secretan y col., 2009; IARC, 2010; IARC, 2012). Además, cada vez hay más pruebas de su asociación con cáncer del sistema nervioso central, estómago, páncreas, próstata y melanoma (de Menezes y col., 2013; Bagnardi y col., 2015).

Sin embargo, la relación entre consumo de alcohol y cáncer de pulmón continúa siendo controvertida porque la evidencia epidemiológica actual no ha constatado, hasta el momento, una asociación clara de riesgo o protección a desarrollar este tipo de neoplasia, ya que los resultados son aún contradictorios e inconsistentes entre países y poblaciones (Bandera y col., 2001; Korte y col., 2002; Freudenheim y col., 2005; Boffetta y Hashibe, 2006; Wakai y col., 2007; Uehara y Kiyohara, 2010; de Menezes, 2013; Bagnardi y col., 2015). También hay que tener en cuenta que la dieta puede ser un importante factor confusor (Bandera y col., 2001). Debido al contenido calórico de las bebidas alcohólicas, su consumo puede sustituir o reemplazar otros alimentos y nutrientes de la dieta, especialmente en individuos con un consumo muy elevado de alcohol. Varios alimentos y nutrientes, como frutas, verduras y carotenoides, pueden disminuir potencialmente el riesgo de cáncer de pulmón, por lo que el riesgo puede ser sobreestimado en bebedores si los factores de la dieta no son considerados (Wakai y col., 2007).

Uno de los principales mecanismos que pueden contribuir a la carcinogénesis mediada por el alcohol incluye el efecto tóxico del acetaldehído, primer metabolito de la oxidación del etanol, dado que la IARC ha clasificado el acetaldehído presente en las bebidas alcohólicas como “carcinógeno en humanos” (IARC, 2011). Experimentos en animales y cultivos celulares han mostrado claramente que el acetaldehído es carcinogénico porque tiene un efecto mutagénico y que puede afectar al ciclo celular, apoptosis y a la reparación del ADN (Feron y col., 1982; Woutersen y col., 1986; Seitz y col., 1998).

La concentración de acetaldehído en los distintos tejidos depende de la producción y degradación del mismo. Ambos pasos metabólicos están modulados por la actividad de las enzimas encargadas del metabolismo del alcohol, la alcohol deshidrogenasa (ADH) y la aldehído deshidrogenasa (ALDH). La exposición a este metabolito del alcohol puede explicar parte de las asociaciones observadas entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer (Seitz y Stickel, 2010).

1.3.1 Metabolismo del Alcohol

Aunque aproximadamente el 90% del metabolismo del alcohol ocurre en el hígado (Agarwal, 2001), hay evidencias del metabolismo del alcohol en el tracto intestinal y de actividad de enzimas metabolizadoras de alcohol en otros tejidos (Saleem y col., 1984). El incremento de la concentración del alcohol en la sangre tras su ingesta depende de la tasa de vaciado gástrico y del primer paso del metabolismo del alcohol por el tracto intestinal y el hígado (Li y col., 2001). El alcohol sin metabolizar es distribuido a otros órganos del cuerpo, con concentraciones relativas en cada órgano dependientes del contenido de agua del órgano (Ramchandani y col., 2001).

Hay tres posibles vías para la oxidación del alcohol a acetaldehído: las alcohol deshidrogenasas (ADHs), que son enzimas citosólicas NAD-dependientes, diméricas y que contienen zinc, que oxidan el etanol a acetaldehído en el citosol de la célula (Druesne-Pecollo y col., 2009); el sistema microsomal de oxidación de etanol (MEOS) en el retículo endoplasmático, donde la oxidación es llevada a cabo por la citocromo P4502E1 (CYP2E1); y a través de la catalasa en los peroxisomas, aunque probablemente no juega un papel importante en el metabolismo del alcohol "in vivo". Aunque la vía principal es la de las ADHs, cuando el consumo de alcohol es elevado o crónico, el sistema MEOS es inducido y la CYP2E1 cataliza la oxidación de etanol a acetaldehído al tiempo que produce especies reactivas de oxígeno (ROS-reactive oxygen species) (Lieber, 2000; Druesne-Pecollo y col., 2009) (Figura 3). Posteriormente, el acetaldehído es oxidado a acetato por la aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Lieber, 2000; Druesne-Pecollo y col., 2009) (Figura 3).

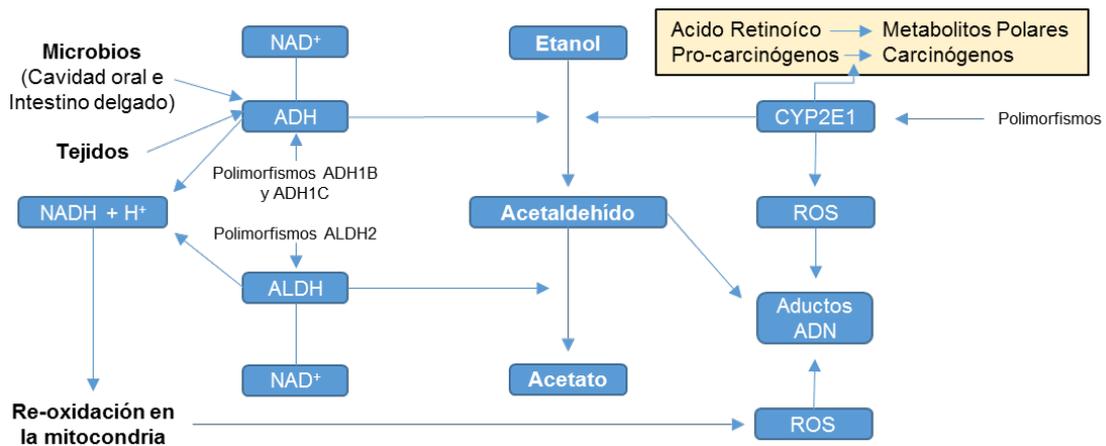


Figura 3: Metabolismo del Alcohol (Seitz y Stickel, 2007)

1.3.2 Mecanismos y efectos del alcohol y el acetaldehído

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales el alcohol y el acetaldehído podrían afectar a la carcinogénesis (Figura 4).

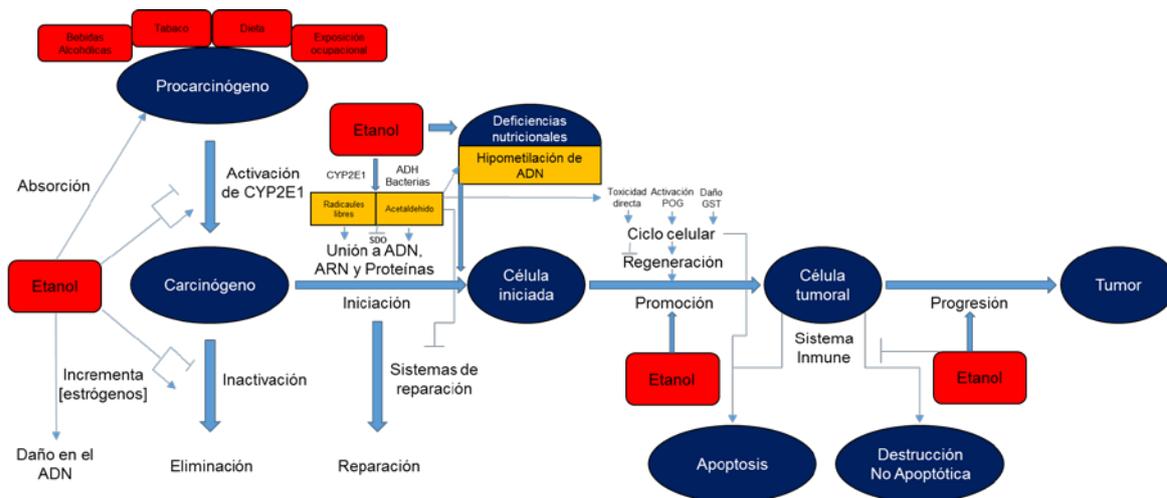


Figura 4: Efecto del etanol en la carcinogénesis. El etanol afecta a la activación de procarcinógenos y posiblemente a la inactivación de carcinógenos. También conlleva un aumento de la absorción de carcinógenos en las células. El etanol es metabolizado por CYP2E1 y ADHs a acetaldehído y radicales libres, y ambos pueden unirse al ADN, ARN y proteínas, especialmente debido a que los sistemas de detoxificación están disminuidos por el etanol. El alcohol también da lugar a deficiencias nutricionales, algunas de las cuales (incluyendo la vitamina A, E y el folato, entre otras) estimulan la carcinogénesis. La deficiencia de folato y metilo junto con la acción del acetaldehído resulta en hipometilación del ADN; además, el acetaldehído inhibe el sistema de reparación nuclear. La toxicidad directa (alcohol/acetaldehído) modula el comportamiento del ciclo celular, dando lugar a cambios en la regeneración celular. El alcohol también actúa como promotor, particularmente en el hígado, que conduce a una inhibición del sistema inmune, y podría estimular la progresión del cáncer. Abreviaturas: SDO, sistema de defensa oxidativo; POG, proto-oncogén; GST, gen supresor de tumores (Adaptado de Seitz y col., 1998)

El metabolismo del etanol conduce a la generación de acetaldehído y radicales libres, que son compuestos altamente reactivos que se unen a los constituyentes celulares y al ADN (Seitz y col., 1998). El acetaldehído se liga rápidamente a las proteínas celulares y al ADN, resultando en una discapacidad morfológica y funcional de la célula y en una reacción inmunológica en cascada. El ligamiento al ADN y la formación de aductos estables, representa uno de los mecanismos por los que el acetaldehído puede provocar errores en la replicación y/o mutaciones en oncogenes o genes supresores de tumores (Fang y Vaca, 1995). La presencia de aductos estables de ADN ha sido demostrada en numerosos experimentos “in vitro” e “in vivo” en cultivos de células eucariotas, procariotas y en modelos animales. En un estudio de 24 grandes consumidores de alcohol y 12 controles, el número medio de aductos de ADN-acetaldehído en los linfocitos fue 7 veces superior en los consumidores de alcohol que en los controles (Fang y Vaca, 1997). Además, ha sido demostrado que el principal aducto estable de ADN, N²-etil-2-deoxiguanosina (N²-Et-dG) puede ser, de hecho, utilizado de manera eficiente por la ADN polimerasa eucariota (Matsuda y col., 1999). Mientras que la formación de N²-Et-dG ha sido demostrada en muestras de ADN procedentes de glóbulos blancos de humanos alcohólicos y en el hígado de ratas que ingerían etanol en el agua potable, hay relativamente poca evidencia de que esta lesión sea mutagénica y la importancia biológica de la lesión no está clara. Sin embargo, esta lesión puede ser detectada en muestras de orina humana, lo que sugiere que puede ser útil como biomarcador de daño del ADN relacionado con el acetaldehído (Matsuda y col., 1999). Datos más recientes han demostrado que en presencia de aminoácidos básicos o histonas, el acetaldehído reacciona con la deoxiguanosina en el ADN para formar otro aducto de ADN, el 1,N²-propano-dG (PdG) (Theruvathu, 2005; Brooks y Theruvathu, 2006). A diferencia de N²-Et-dG, PdG ha sido demostrado que es una lesión mutagénica en el ADN de células de mamíferos “in vivo”.

Los aductos de acetaldehído representan neoantígenos que conducen a la producción de anticuerpos específicos y a la estimulación del sistema inmune, lo que posiblemente conlleva a la respuesta inmune citotóxica (Seitz y col., 2001). Los autoanticuerpos contra las proteínas modificadas por el acetaldehído han sido detectados en la sangre y en la médula ósea de grandes bebedores de alcohol (Latvala y col., 2001) y las concentraciones de autoanticuerpos son mayores en pacientes con enfermedad hepática inducida por alcohol que en los controles no bebedores o que en los grandes bebedores sin enfermedad hepática (Viitala y col., 2000). En general, los estudios

sugieren que el daño en el ADN en el ser humano ocurre después del consumo excesivo de alcohol y que tal daño puede ser causado por el acetaldehído (Boffetta y Hashibe, 2006). Por otro lado, puede haber mayores niveles de malondialdehído y 4-hidroxinonenal, que podrían ser producidos como resultado del metabolismo del acetaldehído. Estas sustancias pueden unirse también al ADN afectando a la transcripción de genes y pueden, con acetaldehído, unirse a proteínas afectando al funcionamiento celular (Eriksson, 2001).

El acetaldehído produce hipometilación del ADN y también merma los mecanismos de reparación del ADN, dado que se ha demostrado que inhibe la O6-metilguaniltransferasa, un enzima importante para la reparación de aductos causados por agentes alquilantes (Espina y col., 1988). También causa mutaciones puntuales en el locus de la hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa (*HPRT1*) en linfocitos humanos, que induce intercambio entre cromátidas hermanas y graves aberraciones cromosómicas (Dellarco, 1988; Helander y Lindahl-Kiessling, 1991), lo que produce inflamación y metaplasia del epitelio traqueal, retrasa la progresión del ciclo celular y aumenta el daño celular asociado con la hiper-regeneración (Seitz y col., 2001).

Otro de los múltiples efectos que produce el acetaldehído es la inducción de la CYP2E1, que conlleva la generación de especies reactivas de oxígeno, el aumento de la activación de procarcinógenos, la modulación de la regeneración celular y deficiencias nutricionales (Poschl y col., 2004; Poschl y Seitz, 2004; Seitz y Becker, 2007; Seitz y Stickel, 2007). La producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno es un posible mecanismo de la carcinogénesis relacionada con el alcohol (Molina y col., 2003). El estrés oxidativo conduce a peroxidación lipídica, cuyos productos son compuestos electrófilos reactivos que reaccionan con el ADN para formar aductos de ADN exocíclicos y aldehídos reactivos (el Ghissassi y col., 1995). Este mecanismo es particularmente relevante para la carcinogénesis hepática y podría explicar el efecto sinérgico del alcohol e infección viral (Boffetta y Hashibe, 2006). Como ya hemos comentado, la inducción de la CYP2E1 también está asociada a una mayor activación de una variedad de procarcinógenos que incluyen a las nitrosaminas (Seitz y col., 1998). También puede inhibir las enzimas de fase II, afectando a la eliminación o aclaramiento de carcinógenos (Singletary y Gapstur, 2001).

Algunas de las asociaciones observadas entre el alcohol y el cáncer pueden ser causadas por los efectos del alcohol sobre el estado de los nutrientes que son de importancia para la etiología del cáncer. El consumo excesivo de alcohol puede llevar a deficiencias nutricionales por la ingesta reducida de alimentos ricos en micronutrientes, por una absorción intestinal alterada y por los cambios en las rutas metabólicas (Lieber, 2003). Por ejemplo, el consumo de alcohol tiene un impacto negativo en la absorción, utilización y excreción del folato (Herbert y Kshitish, 1994), dado que ha sido demostrado que el acetaldehído destruye el folato "in vitro" (Shaw y col., 1989). El folato interviene en la metilación del ADN, y por lo tanto, en el control de los genes con un posible papel en la carcinogénesis (Voigt, 2005). Por ello, no es sorprendente que una dieta baja en folato también esté asociada con un aumento del riesgo de cáncer en humanos (Giovannucci y col., 1995), dado que se ha demostrado que la hipometilación de ciertos genes funcionales ocurre en las primeras etapas del desarrollo del cáncer. En consecuencia, la escisión del folato podría ser otro efecto del acetaldehído que promueve la formación de tumores.

También ha sido propuesto que una deficiencia de vitamina A podría ser un mecanismo carcinogénico mediado por el alcohol, dado que el alcohol podría interferir con la absorción de la vitamina A, incrementando su degradación (Seitz y col., 1998) e interfiriendo con la síntesis de ácido retinoico, un importante factor para la regeneración y diferenciación celular (Seitz, 2000), a partir de retinal (Lieber, 2000; Agarwal, 2001). El consumo de alcohol podría afectar también a la ingesta, absorción y metabolismo de otros nutrientes (como algunos carotenoides, la vitamina C, la vitamina B12 y la vitamina B6) que se han sugerido que están relacionados con el riesgo de cáncer (Lieber, 2000; Singletary y Gapstur, 2001). El metabolismo del alcohol a través de la CYP2E1 que, como ya hemos mencionado, conduce a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, que a su vez pueden exacerbar los efectos de los bajos niveles de vitaminas antioxidantes.

Además de la acción del acetaldehído, otros mecanismos pueden estar implicados en el proceso carcinogénico asociado al alcohol:

El alcohol puede tener efectos tanto agudos como crónicos en las concentraciones de hormonas en la sangre. Se ha visto que un aumento en las concentraciones de estrógenos y en los metabolitos urinarios de estrógenos, y un descenso de la globulina

transportadora de hormonas sexuales, están asociados con el consumo de alcohol (Dorgan y col., 1994; Muti y col., 1998; Ginsburg, 1999; Onland-Moret y col., 2005). Además, el consumo crónico excesivo de alcohol también afecta a la aromatización de andrógenos a estrógenos en modelos animales (Purohit, 2000). Estos mecanismos pueden ser importantes para los tumores sensibles a las hormonas como los cánceres de mama y próstata.

Las propiedades físicas del alcohol también pueden ser de importancia, particularmente para los tejidos que entran en contacto directo con las bebidas alcohólicas, como el tracto gastrointestinal superior. Se ha sugerido que las propiedades como solvente del alcohol pueden aumentar los efectos de la exposición a agentes cancerígenos, tales como los del tabaco, lo que podría explicar en parte la evidencia del efecto sinérgico entre el alcohol y el tabaco en el riesgo de varios cánceres. (Simonotti y col., 1995). Es más, la exposición local al alcohol puede afectar a los tejidos debido a su efecto tóxico, que conduce a la lesión celular y de la membrana, y posteriormente a la proliferación celular. La hiperproliferación incrementa la susceptibilidad a los carcinógenos inhalados o ingeridos. Una hiperproliferación permanente es también el primer paso en el proceso multietapa de la transformación maligna (Seitz y col., 1998).

Por otro lado, componentes de las bebidas alcohólicas distintos del etanol, incluidos los contaminantes y las impurezas, podrían incrementar el riesgo de cáncer. Se han encontrado hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en licores fuertes (por ejemplo wiski) y N-nitrosaminas en la cerveza, sin embargo la información sobre los ingredientes de las bebidas alcohólicas, especialmente en licores fuertes, es limitada (IARC, 1988).

El hecho de que el alcohol pueda actuar como un agente carcinógeno se cree que también puede ser debido, en parte, a la existencia de variaciones o alteraciones genéticas, entre las que destacamos los SNPs en los genes que participan en el metabolismo del etanol y del acetaldehído. Es más, el consumo de alcohol podría interactuar con otros genes, que codifican enzimas implicadas en diferentes rutas biológicas como el metabolismo del folato, y podría afectar al riesgo de cáncer.

1.4 SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA INDIVIDUAL: POLIMORFISMOS Y CÁNCER DE PULMÓN

Como ya hemos comentado anteriormente, el tabaco es la mayor causa de cáncer de pulmón, pero sólo un 10-15% de los fumadores desarrolla este tumor. Esto indica que existen diferencias interindividuales de respuesta debidas a la edad, género, raza, factores nutricionales, hormonales e inmunológicos, así como factores genéticos que contribuyen a modificar la susceptibilidad individual a desarrollar cáncer. Los factores genéticos también contribuyen a la aparición y desarrollo del cáncer de pulmón, ya que se ha observado que los fumadores con parientes con cáncer de pulmón tienen un riesgo entre 2,56 y 5,91 veces mayor de desarrollar la enfermedad, lo que quizás pueda deberse a un efecto de agregación familiar (Jin y col., 2005). De igual forma, también es posible que la distinta susceptibilidad al desarrollo de un tumor entre fumadores sometidos a los mismos factores ambientales, se deba a pequeñas diferencias genéticas entre ellos.

La finalización de la secuenciación del genoma humano en el año 2001 permitió observar la existencia de numerosos cambios en la secuencia del ADN responsables de la variabilidad entre distintos individuos. Estos cambios denominados polimorfismos son la base de la evolución y se pueden dividir en tres grandes grupos: polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), microsatélites y deleciones de fragmentos de 100 pb a varios miles de pb. Los polimorfismos que se consolidan bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (Begovich y col., 2004; Bottini y col., 2004; Klein y col., 2005).

1.4.1 Polimorfismos de un único nucleótido (SNPs)

Los SNPs son los polimorfismos más abundantes y se estima que existen unos 7 millones en el genoma. Sólo una pequeña parte de ellos, de 50.000 a 300.000, están situados en regiones codificantes, pero la presencia de uno de estos polimorfismos es suficiente para producir el cambio de la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica ese gen. El efecto de la mayoría de estos polimorfismos sobre la actividad de las proteínas a las que afectan aún no se conoce con exactitud, pero son responsables de las diferencias observadas entre distintos individuos y pueden contribuir en cierta medida a la distinta susceptibilidad a desarrollar un cáncer. Estos polimorfismos pueden afectar al

nivel de expresión, la estructura o la actividad catalítica de enzimas metabólicas que activan o inactivan carcinógenos, así como a las enzimas reparadoras del ADN.

Existen muchas patologías relacionadas con estos cambios en una única base, por ejemplo, en el gen de la apolipoproteína E (ApoE) se han descrito varios SNPs. Uno de ellos, denominado ApoE ϵ -4, que produce un cambio en el aminoácido cisteína en la posición 112 por una arginina, se asocia a mayor riesgo a desarrollar la enfermedad de Alzheimer (Strittmatter y col., 1993). Si el cambio de un único nucleótido ocurre en una zona codificante como en el ejemplo de la ApoE, puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína resultante, lo que puede dar lugar a una modificación de su actividad o función. En otras ocasiones los cambios pueden producirse en regiones no codificantes, como es el caso de los intrones. Cambios en su estructura pueden influir en la expresión del gen, aunque la mayoría de las veces, los cambios no tienen repercusiones funcionales. Los SNPs pueden producirse también en zonas del promotor de un gen y en este caso, modificar su expresión, puede alterar la cantidad de proteína expresada. Un estudio realizado sobre esquizofrenia en población asiática, muestra que los individuos portadores de los polimorfismos -291 C/T, -616 G/C, -809 G/A en el promotor del gen receptor de la dopamina (*DRD4*), tienen entre 1,28 y 2,8 veces más riesgo a desarrollar esta patología psiquiátrica (Nakajima y col., 2007).

Aunque como ya hemos comentado anteriormente la mayoría de los polimorfismos son funcionalmente neutros, algunos pueden ejercer efectos específicos de un alelo en la regulación de la expresión del gen o función de la proteína codificada, generando así diferencias entre individuos en diversos aspectos biológicos como la susceptibilidad al cáncer o la evolución de la misma, así como la respuesta a distintos tratamientos oncológicos. En este sentido, la identificación de polimorfismos en genes implicados en diferentes procesos celulares ha permitido realizar estudios epidemiológicos caso-control que comparan la prevalencia en pacientes con cáncer y controles no afectados. Estos estudios han puesto de manifiesto que algunos de los polimorfismos estudiados alteran sustancialmente el riesgo de cáncer y pueden considerarse, por tanto, genes de susceptibilidad (Peto, 2001). Un ejemplo claro de asociación entre polimorfismos en regiones codificantes y cáncer lo encontramos en el caso de los enzimas arilamina N-acetil transferasa (NAT2) o glutathione S-transferasas (GSTs). Mientras que el polimorfismo de acetilación lenta de NAT2 está asociado con un aumento del riesgo a desarrollar cáncer de vejiga, especialmente en fumadores (Marcus y col., 2000; Vineis y

col., 2001; Hein 2002), el genotipo nulo en *GSTM1* está asociado, según Garcia-Closas, con un aumento del riesgo a desarrollar cáncer de vejiga (Garcia-Closas y col., 2005) así como con una mayor capacidad invasiva en adenocarcinoma de colon (Moore y col., 2005).

Al igual que en las patologías como la ataxia de Friedrich y la esquizofrenia, polimorfismos en regiones no codificantes, también pueden influir en el riesgo a desarrollar determinados tipos de cáncer. Así, recientemente se ha caracterizado un polimorfismo en el promotor del gen *MDM2* (-309 T/G), que parece atenuar la función del supresor de tumores p53 y acelerar la formación de tumores (Bond y col., 2004). Así mismo, se ha demostrado que la presencia de este polimorfismo -309 T/G en el promotor del gen *MDM2* aumenta el riesgo a desarrollar, entre otros, cáncer gástrico (Ohmiya y col., 2006) y adenocarcinoma de pulmón (Park y col., 2006).

En el caso del cáncer de pulmón, la susceptibilidad genética individual puede venir determinada entre otras, por diferencias en el metabolismo de los carcinógenos, enzimas implicados en la detoxificación o en la cantidad de proteínas implicadas en muchos aspectos del desarrollo tumoral. Así, se ha encontrado que polimorfismos en regiones codificantes, como en el caso del gen *CYP1A1*, que codifica el citocromo P450A1, el cual participa en la activación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), aumenta el riesgo de cáncer de pulmón (Le Marchand y col., 2003; Taioli y col., 2003; Vineis y col., 2003). Por el contrario, polimorfismos en genes implicados en la inactivación de carcinógenos activados, GSTs, son contradictorios, ya que algunos encuentran aumento de riesgo y otros no encuentran asociación (Houlston, 1999; Mohr y col., 2003; Nazar-Stewart y col., 2003; Sorensen y col., 2004; Lopez-Cima y col., 2012). Estos datos muestran la utilidad del estudio de polimorfismos en genes para comprender la distinta susceptibilidad individual en el caso del cáncer de pulmón.

También se ha sugerido que el consumo de alcohol puede desempeñar un papel importante en la variabilidad individual. La investigación sobre la variación genética en el metabolismo del alcohol indica que polimorfismos en genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol y el acetaldehído pueden determinar, entre otros factores, la predisposición de un individuo a desarrollar cáncer asociado al alcohol (Poschl y col., 2004). Esta predisposición individual basada en los polimorfismos que posea cada individuo, será uno de los objetivos principales a determinar en este estudio.

1.5 POLIMORFISMOS GENÉTICOS EN ENZIMAS METABOLIZADORAS DEL ALCOHOL

Se han observado polimorfismos funcionales en varios genes que codifican proteínas enzimáticas encargadas del metabolismo del alcohol. Todos ellos actúan alterando la tasa de síntesis del metabolito tóxico acetaldehído o disminuyendo su posterior oxidación (Agarwal, 2001). Individuos que acumulan acetaldehído debido a estos polimorfismos, se ha demostrado que tienen un mayor riesgo de cáncer (Harty y col., 1997; Yokoyama y col., 1998). Sin embargo, una selección positiva de tales polimorfismos genéticos en algunas poblaciones podría actuar como un factor protector contra el abuso del alcohol y los resultados de enfermedades relacionadas con el alcohol. De este modo, la investigación de los mecanismos moleculares que controlan e influyen el metabolismo del alcohol es importante en la comprensión de las bases bioquímicas de la toxicidad del alcohol y las consecuencias farmacológicas y adictivas en humanos relacionadas con el abuso del alcohol. La identificación de variantes en genes estructurales y la caracterización de los supuestos o presuntos genes de vulnerabilidad al alcoholismo puede ayudar en la mejora de los enfoques preventivos y de tratamiento (Agarwal, 2001).

1.5.1 Enzima Alcohol deshidrogenasa (ADH)

Las ADHs son una familia de enzimas cuyos genes se corresponden estrechamente entre sí, y se localizan en el cromosoma 4 (Edenberg, 2000). La ADH humana es una proteína dimérica, que contiene zinc y consiste en dos subunidades con un peso molecular de 40kD cada una, que oxida las cadenas cortas de los alcoholes a aldehídos, principalmente formaldehído y acetaldehído (Agarwal, 2001).

Las funciones de la ADH van desde la oxidación de las pequeñas cantidades de alcohol endógeno producido por los microorganismos, a la oxidación de etanol exógeno y otros alcoholes consumidos en la dieta, con la concomitante producción de NADH, y tal vez, la de oxidar sustratos que participan en el metabolismo de esteroides y ácidos biliares. El enzima tiene una gran especificidad de sustrato y oxida diversos alcoholes primarios principalmente en el hígado, tracto gastrointestinal, riñones, mucosa nasal, testículos y útero.

Hasta el momento se conocen siete genes que codifican las ADHs humanas y más de 20 isoenzimas que varían en sus propiedades farmacocinéticas dependiendo de:

1. Los tipos de alcoholes que preferentemente oxidan.
2. La cantidad de alcohol que tiene que acumularse antes de que ocurra una degradación apreciable.
3. La tasa máxima a la que oxidan el alcohol.

Las ADHs humanas pueden ser divididas en cinco clases principales o grupos distintos (I-V) de acuerdo con su subunidad y la composición de la isoenzima, así como con sus propiedades fisicoquímicas (Jörnvall y Höög, 1995) (Tabla 1).

Las isoenzimas de clase I son combinaciones de homo y/o heterodímeros de subunidades alfa, beta y gamma codificadas por tres genes diferentes situados en distintos loci en el cromosoma 4: *ADH1A*, *ADH1B* y *ADH1C*. Se han descrito polimorfismos en el gen *ADH1B* dando lugar a tres tipos de subunidades beta (β) y en el gen *ADH1C* originando dos tipos de subunidades gamma (γ) (Tabla 1).

Tabla 1. Genes de las ADHs humanas

CLASE	ALELO	SUBUNIDAD	ISOENZIMAS DIMÉRICAS	LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA
Clase I ADH				
ADH1A	<i>ADH1A</i>	α	$\alpha\alpha, \alpha\beta1, \alpha\beta2, \alpha\gamma1, \alpha\gamma2$	4q22
ADH1B	<i>ADH1B</i> Arg48, Arg370	$\beta1$	$\beta1\beta1, \beta1\beta2, \beta1\gamma1, \beta1\gamma2$	4q22
	<i>ADH1B</i> His48, Arg370	$\beta2$	$\beta2\beta2, \beta2\gamma1, \beta2\gamma2$	
	<i>ADH1B</i> Arg48, Cys370	$\beta3$	$\beta3\beta3$	
ADH1C	<i>ADH1C</i> Ile349	$\gamma1$	$\gamma1\gamma1, \gamma1\gamma2$	4q22
	<i>ADH1C</i> Val349	$\gamma2$	$\gamma2\gamma2, \gamma1\gamma2$	
Clase II ADH				
ADH4	<i>ADH4</i>	π	$\pi\pi$	4q21-25
Clase III ADH				
ADH5	<i>ADH5</i>	χ	$\chi\chi$	4q21-25
Clase IV ADH				
ADH7	<i>ADH7</i>	σ	$\sigma\sigma$	4q23-24
Clase V ADH				
ADH6	<i>ADH6</i>	?*	?*	4q21-25

* No se conoce la composición de la subunidad

1.5.1.1 Polimorfismos en el gen *ADH1B*

El gen *ADH1* (anteriormente denominado *ADH2*), localizado en el cromosoma 4q22, codifica una enzima encargada de metabolizar el alcohol en acetaldehído. El gen *ADH1B* tiene dos polimorfismos que podrían modular la capacidad de oxidar el alcohol y la conducta de beber (Druesne-Pecollo y col., 2009). El polimorfismo más relevante es el Arg48His, localizado en el exón 3, que supone un cambio de aminoácido de Arginina (CGC) a Histidina (CAC) en el codón 48 (Smith, 1986). Estudios “in vitro” han demostrado que el alelo variante His en la posición 48 codifica una subunidad superactiva para la ADH1B, que tiene una $V_{m\acute{a}x}$ 40 veces mayor que la subunidad menos activa Arg/Arg (Bosron y Li, 1986; Yoshida y col., 1991). El alelo variante His es común en poblaciones asiáticas con una frecuencia que oscila entre el 10% y el 90%. En poblaciones europeas y africanas, la frecuencia del alelo His no excede del 10% y 15%, respectivamente (Brennan y col., 2004; Quertemont, 2004).

También se ha descrito otro polimorfismo en el exón 9 del gen *ADH1B*, el Arg370Cys, que supone un cambio de aminoácido de Arginina por Cisteína en el codón 370 (Brennan y col., 2004). Se ha visto que el alelo variante Cys, codifica una

subunidad superactiva para la ADH1B de forma que aumenta 90 veces la velocidad de oxidación del etanol a acetaldehído, en comparación con el alelo salvaje Arg. (Hashibe y col., 2006). El alelo salvaje Arg, es el alelo predominante en la mayoría de las poblaciones (Druesne-Pecollo y col., 2009). El alelo variante Cys ha sido observado en indios americanos del suroeste, en americanos africanos y en grupos en el Caribe de origen africano (Iron y col., 1992; Thomasson y col., 1995; Viljoen y col., 2001; Wall y col., 2003; Ehlers y col., 2007).

En ambos polimorfismos, la sustitución ocurre en un aminoácido que hace contacto con la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺), que es requerida para la oxidación del etanol (Hurley y col., 2002). En ambos casos, las substituciones resultan en enzimas que tienen una tasa de recambio de 70 a 80 veces mayor que la subunidad codificada por el alelo salvaje, lo cual es debido a que la coenzima se libera más rápidamente al final de la reacción. Desde el punto de vista biológico, el alelo salvaje Arg, que codifica una enzima menos activa, da lugar a una menor exposición al acetaldehído en los tejidos (Druesne-Pecollo y col., 2009). Por el contrario, tanto el alelo variante His como el alelo variante Cys codifican una enzima que convierte rápidamente el etanol en acetaldehído, lo que daría lugar a un aumento del tiempo que el acetaldehído permanece en contacto con los tejidos y a un incremento del nivel de acetaldehído en ellos (Druesne-Pecollo y col., 2009).

1.5.1.2 Polimorfismos en el gen *ADH1C*

La ADH1C (anteriormente denominada ADH3) es una enzima que participa, al igual que la ADH1B, en la metabolización del alcohol catalizando el paso de etanol a acetaldehído. El gen *ADH1C*, se encuentra localizado en el cromosoma 4q22 y presenta en su secuencia variaciones genéticas que producen una diferente actividad enzimática. Entre estas variaciones, podemos destacar dos SNPs. Uno de ellos supone un cambio de Adenina (A) por Guanina (G) que genera un cambio de aminoácido de Isoleucina (Ile) por Valina (Val) en el aminoácido 349 de la proteína (Ile349Val) (Boffetta y Hashibe, 2006). En este caso se cree que las personas que poseen la variante más activa (Ile349), tienen un mayor riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer relacionado con el alcohol, ya que el alelo Ile produce acetaldehído de forma más rápida. Sin embargo, estudios en poblaciones occidentales, no han mostrado resultados coherentes de esta asociación (Coutelle y col., 1997; Harty y col., 1997; Bouchardy y col., 2000; Olshan y col., 2001;

Schwartz y col., 2001; Sturgis y col., 2001). En personas de origen étnico blanco ningún alelo predomina dado que el 45-70% son heterocigotos Ile/Val (*ADH1C* Ile/Val). Por otro lado, la frecuencia del alelo Ile es de 75-90% en africanos y de 85-100% en poblaciones asiáticas (Druesne-Pecollo y col., 2009).

El otro SNP (Gln272Arg) supone un cambio del aminoácido Glutamina por Arginina en la posición 272. En este caso, el alelo Gln codifica una enzima más activa (Boffetta y Hashibe, 2006).

1.5.2 Enzima Aldehído deshidrogenasa (ALDH)

La aldehído deshidrogenasa es una enzima que interviene en el metabolismo del etanol catalizando la segunda reacción de la ruta, que es la oxidación dependiente de NAD⁺ de acetaldehído a acetato. Se trata de una enzima tetramérica localizada en el citosol (ALDH1) y en la mitocondria (ALDH2). La enzima mitocondrial codificada por el gen *ALDH2*, situado en el cromosoma 12, es la principal responsable de la oxidación del acetaldehído en el hígado, mostrando una gran afinidad por el sustrato (Hsu y col., 1986).

1.5.2.1 Polimorfismos en el gen *ALDH2*

En el gen *ALDH2* se ha descrito un polimorfismo funcional en la posición 504 que conduce a un cambio de aminoácido de Ácido glutámico por Lisina (Glu504Lys) (Boffetta y Hashibe, 2006). El alelo variante Lys da lugar a una subunidad inactiva de la enzima, de forma que los homocigotos para este polimorfismo no pueden oxidar el acetaldehído y los heterocigotos lo hacen de forma ineficiente (tienen aproximadamente un 6% de actividad residual). Ambos grupos se caracterizan por un fenotipo-ALDH2 deficiente (Crabb y col., 1989). El alelo variante Lys es prevalente en asiáticos, con una frecuencia de hasta el 40%, mientras que no excede del 5% en poblaciones europeas y africanas (Druesne-Pecollo y col., 2009). Se ha sugerido que el alelo Lys es un factor de protección frente al alcoholismo, ya que tras un consumo incluso moderado de alcohol, exhiben enrojecimiento facial “flushing” y otros síntomas desagradables, siendo estos efectos más graves en los homocigotos (Lys/Lys). Sin embargo, sería un factor de riesgo frente al cáncer ya que el acetaldehído permanecería más tiempo en el organismo, teniendo más probabilidades de que cause su efecto cancerígeno.

Diversos estudios han analizado la combinación de distintos polimorfismos en genes implicados en la metabolización del alcohol. Así, por ejemplo, cuando en el genotipo de un individuo aparecen las variantes *ALDH2* Lys504 y *ADH1B* His48, se produce un efecto aditivo de protección frente a la adicción al alcohol. El aumento de la formación de acetaldehído y la disminución en su eliminación, conducen a una mayor acumulación de acetaldehído en el organismo tras el consumo de alcohol. El que estas variantes resulten en la expresión de un fenotipo de efecto aversivo tras la ingestión de alcohol, ha llevado a investigar su relación con el alcoholismo (Matsuo y col., 2006; Yang y col., 2007).

1.5.3 Sistema Microsomal de Oxidación de Etanol (MEOS - “Microsomal ethanol oxidizing system”)

Una pequeña pero significativa parte del etanol ingerido (10% o menos) es metabolizado por rutas alternativas a las ADHs. Una vez que la vía de la ADH se satura debido a las altas concentraciones de etanol, tras un consumo crónico o elevado de alcohol, la actividad del Sistema Microsomal de Oxidación de Etanol (MEOS) aumenta, con un incremento asociado de la actividad en las citocromos P450, especialmente la CYP2E1 (Lieber, 1997; Agarwal, 2001). La CYP2E1 es un miembro de la súperfamilia de las citocromos P450, cuyo gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 10. (Lieber, 1997; Nebert y col., 1999). La CYP2E1 se expresa predominantemente en el hígado y, en menor medida, en otras localizaciones como el riñón, mucosa nasal, pulmón, intestino, colon y linfocitos (Krishna y Klotz, 1994; Pasanen y Pelkonen, 1994; Hukkanen y col., 1997; Lechevrel y col., 1999).

Es una enzima natural inducible por etanol que es capaz de catalizar la biotransformación no sólo del etanol, sino también de otros sustratos como carcinógenos presentes en el tabaco (N-nitrosaminas, benceno, uretano, butadieno y estireno) y más de 80 sustancias de bajo peso molecular considerados como cancerígenos potenciales, en metabolitos tóxicos creando radicales libres en forma de intermediarios reactivos de oxígeno (O_2), que conduce a estrés oxidativo que produce lesiones en el ADN que pueden iniciar la carcinogénesis (Druesne-Pecollo y col., 2009; Webb y col., 2011). Estas enzimas actúan aumentando la polaridad de sus sustratos, facilitando su eliminación y por ello se las denomina, a menudo, como las enzimas de desintoxicación. Sin embargo, los productos metabólicos que producen son generalmente

más tóxicos que los compuestos parentales. Esto es particularmente cierto para varios carcinógenos químicos y una serie de compuestos que causan lesiones celulares en el pulmón, hígado y riñón. Los carcinógenos químicos son, generalmente, químicamente inertes y requieren activación metabólica por enzimas celulares para ejercer sus efectos perjudiciales (Villard y col., 1998). Se ha demostrado que muchos de estos productos químicos causan toxicidad en mamíferos después de la activación metabólica por las citocromos P450 (principalmente las subfamilias CYP1A, 2E y 3A) y desempeñan un papel importante en la etiología de ciertos cánceres humanos (Gonzalez y Gelboin, 1994). Debido a la importancia del papel de la CYP2E1 en la activación metabólica de carcinógenos, podría especularse que diferentes variantes alélicas del gen *CYP2E1* podrían causar diferentes niveles de expresión. Esto podría ser importante para la tasa de activación metabólica y por lo tanto, para la susceptibilidad individual a la exposición a carcinógenos (Persson y col., 1993).

Los estudios epidemiológicos sugieren que algunos de los polimorfismos genéticos en el gen *CYP2E1*, incluyendo el *RsaI* y *DraI*, están relacionados con susceptibilidad genética para cáncer (Uematsu y col., 1991; Kato y col., 1992; Hirvonen y col., 1993; Hildesheim y col., 1995; Wu y col., 1998) y enfermedades hepáticas (Agundez y col., 1996; Lucas y col., 1996; Savolainen y col., 1997). Sin embargo, también se han aportado resultados opuestos que no apoyan el papel de los polimorfismos en el gen *CYP2E1* en las enfermedades humanas (Hirvonen y col., 1993; Agundez y col., 1996; Kato y col., 1994; Watanabe y col., 1995; Wu y col., 1998).

La actividad de la CYP2E1 también está modulada por varios factores fisiológicos determinantes tales como la obesidad (O'Shea y col., 1994), el ayuno (O'Shea y col., 1994) y disfunción hepática (Dilger y col., 1997) y puede ser inducida por etanol (Girre y col., 1994). Por el contrario, los isotiocianatos de la dieta (Leclercq y col., 1998) y el ajo (Yang y col., 1994; Reicks y Crankshaw, 1996), así como algunos medicamentos tales como el disulfiram (Kharasch y col., 1993) y el clormetiazol (Gebhardt y col., 1997), inhiben su actividad. Una serie de factores ambientales pueden, por lo tanto, modificar el riesgo de cáncer a través de la actividad enzimática alterada de la CYP2E1.

En el caso del cáncer de pulmón, varias exposiciones químicas son, sin duda, reconocidas como una causa de este tipo de neoplasia y la predisposición genética parece modular sus efectos. Se piensa que todos los individuos tienen una combinación

única de características polimórficas que modifican la susceptibilidad genética y la respuesta a fármacos, productos químicos y cancerígenos. Debido a que hay un gran número de enzimas que activan carcinógenos y enzimas detoxificantes, la variación en sus funciones y la complejidad de la exposición a agentes carcinógenos pueden resultar en diferentes susceptibilidades de los individuos (Klinchid y col., 2009).

1.5.3.1 Polimorfismos en el gen *CYP2E1*

Polimorfismos genéticos en el gen *CYP2E1* podrían ser un factor que contribuye al riesgo de cáncer, dado que esta enzima activa procarcinógenos tales como N-nitrosaminas, benceno, butadieno, cloruro de vinilo, hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros productos químicos de bajo peso molecular (Wang y col., 1999). En cuanto al gen *CYP2E1*, se han identificado varios polimorfismos utilizando diferentes enzimas de restricción (Ingelman-Sundberg y col., 1993). El polimorfismo analizado con *RsaI* se localiza en la región reguladora de la transcripción 5'. Este polimorfismo supone una transición de Citosina a Timina en la posición -1019. El alelo variante c2 (Timina) está asociado con una mayor actividad transcripcional (10 veces mayor), niveles elevados de proteína y una mayor actividad enzimática en comparación con el alelo más común c1 (Citosina) (Ball y col., 1995; Grove y col., 1998). Dos estudios han reportado un mayor consumo de alcohol (Grove y col., 1998; Sun y col., 2002) y una mayor prevalencia de alcoholismo (Konishi y col., 2003) en mejicanos americanos portadores del alelo variante c2. El alelo variante c2 está presente aproximadamente en el 20-25% de los asiáticos y en menos del 10% de las personas de origen étnico blanco (Hildesheim y col., 1997).

Otro polimorfismo detectable con el enzima de restricción *DraI* en el intrón 6 es el T7632A (rs6413432), que resulta de una transversión de Timina a Adenina que da lugar a un aumento de la transcripción del gen *CYP2E1* (Uematsu y col., 1994) y se asocia con un aumento de la expresión y actividad de la enzima (Parsian y col., 1998). Se ha sugerido que el alelo variante C (Adenina) está asociado con un mayor riesgo de desarrollar alcoholismo en población japonesa (Iwahashi y col., 1998). Además, se ha descrito que este alelo tiene una relación con la incidencia de cáncer de pulmón en una población japonesa (Uematsu y col., 1994). La frecuencia del alelo variante C oscila entre poblaciones, encontrándose en un 26% en asiáticos y un 10% en caucásicos (Hu y col., 1997).

Un tercer polimorfismo en el gen *CYP2E1* localizado en el intrón 7, se detecta con la enzima de restricción *TaqI* y supone una transversión de Citosina a Guanina (Montano-Loza y col., 2006). Aunque no hay evidencia de que el polimorfismo *TaqI* tenga un impacto en el metabolismo del alcohol, se ha visto en un estudio de una población caucásica que un grupo de individuos con enfermedad hepática alcohólica mostraba una frecuencia significativamente menor del alelo menos común (4,9%) del polimorfismo *TaqI*, en comparación con el grupo control sano (13,5%) (Wong y col., 2000). El polimorfismo *TaqI* es tan frecuente en poblaciones blancas como el polimorfismo *DraI*, con una frecuencia del alelo *TaqI* menos común (Guanina) de 0,08 a 0,10 (McBride y col., 1987; Persson y col., 1993; Carrière y col., 1996). Para el polimorfismo *TaqI* no hay información alguna sobre la relación entre la actividad del polimorfismo y la incidencia de cáncer (Sangrajrang y col., 2006).

1.6 METABOLISMO DEL FOLATO

Muchos estudios epidemiológicos han proporcionado evidencias de que el alto consumo de frutas y verduras está asociado con un menor riesgo de cáncer de pulmón (Steinmetz y col., 2001-a; Steinmetz y col., 2001-b; Takezaki y col., 2001). El folato es una vitamina B hidrosoluble, uno de los principales micronutrientes en frutas y verduras (Herbert, 1987) y se ha demostrado que la baja ingesta de folato en la dieta es un factor importante en el desarrollo de cáncer, incluyendo el de pulmón, mama, colorrectal, vejiga y páncreas (Choi y Mason, 2002; Shen y col., 2003; Shrubsole y col., 2004; Schabath y col., 2005; Larsson y col., 2006). El folato está implicado en eventos como la metilación, síntesis y reparación del ADN (Xu y col., 2007), eventos en los que el folato participa como donante de un carbono y en los que sus productos metabólicos proporcionan grupos metilo para la síntesis de metionina y metilación del ADN (Heijmans y col., 2003). La enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) juega un papel central en el metabolismo del folato regulando el flujo de folato entre dos importantes vías: la producción de timidilato y purinas para la síntesis de ADN y el suministro de grupos metilo para la síntesis de metionina y la metilación del ADN (Choi y Mason, 2002) (Figura 5).

La actividad MTHFR cataliza la conversión irreversible de 5,10-metilentetrahidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, el cual es la principal forma circulante del folato y el donante primario de grupos metilo para la síntesis de la metionina y para la

metilación del ADN (Ma y col., 1997). Para ser más específicos, el papel que desempeña el 5-metiltetrahidrofolato en la metilación del ADN se debe a que sirve como sustrato para la remetilación de la homocisteína a metionina, con la posterior producción de S-adenosilmetionina, donante universal de grupos metilo, que participa en más de 100 reacciones bioquímicas, incluyendo la metilación del ADN (Kim, 1999).

Por otro lado, el 5,10-metilentetrahidrofolato es requerido como sustrato para la síntesis de ADN, concretamente para la síntesis de timidilato y purinas. La MTHFR participa en la producción de dTMP (desoxitimidilato o desoxitimidina 5'-monofosfato), a través de la timidilato sintasa, y en la síntesis de purinas, desempeñando un papel en la provisión de nucleótidos esenciales para la síntesis y reparación del ADN (Choi y col., 1998). Por tanto, una disminución de 5,10-metilentetrahidrofolato resulta en la incorporación errónea de uracilo en el ADN y la eliminación de esta base anormal puede conducir a roturas simples y dobles de las hebras del ADN y la subsiguiente inestabilidad del ADN asociada a un aumento de la frecuencia de la rotura cromosómica (Blount y col., 1997).

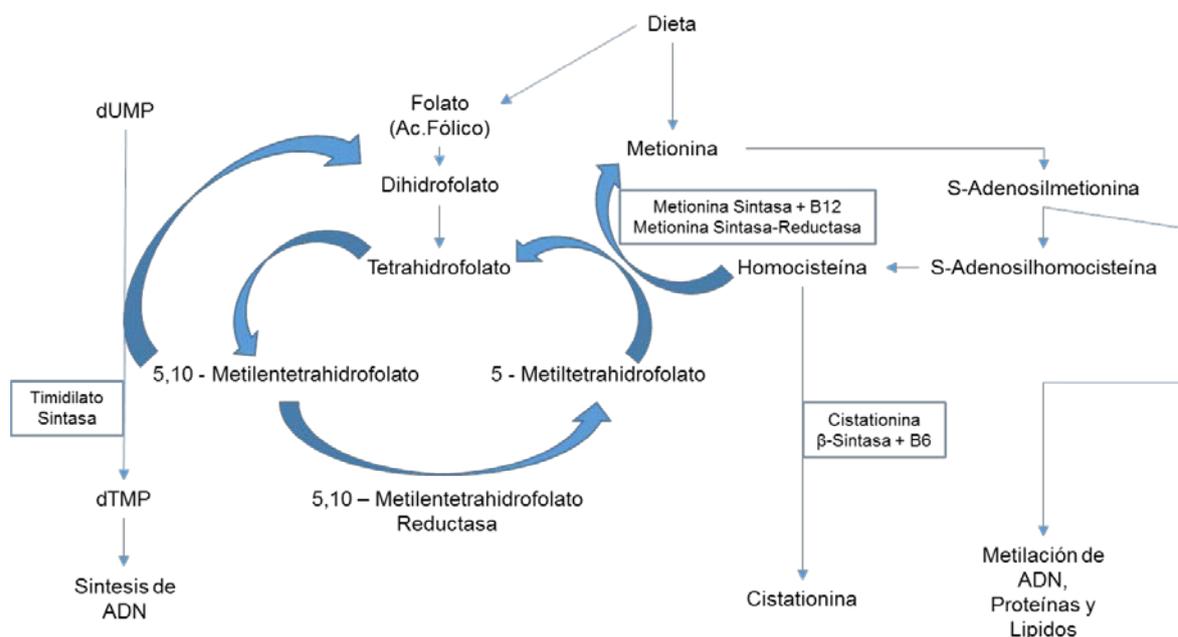


Figura 5: Metabolismo del Folato (Sharp y Little, 2004)

Por tanto, la deficiencia de folato podría disminuir la capacidad de reparación del ADN y favorecer la hipometilación global y/o regional del ADN, que parece ser un evento temprano y consistente en la carcinogénesis (Zingg y Jones, 1997). Dado que se ha

sugerido la metilación del ADN como uno de los mecanismos moleculares por los cuales es regulada la expresión génica (Jacob y col., 1998), la hipometilación está asociada con inestabilidad genómica (Laird y Jaenisch, 1996), estructura cromosómica anormal (Lewis y Bird, 1991) y expresión anormal de oncogenes y genes supresores de tumores (Baylin y col., 1991).

Por todas estas razones, la actividad de la MTHFR y la disponibilidad del folato podrían afectar a la expresión genética (a través de la metilación del ADN) y a la integridad genómica (a través de la síntesis y reparación del ADN) (Druesne-Pecollo y col., 2009).

Un consumo elevado de alcohol parece interferir con la utilización del folato, aumentando los requerimientos debido a que puede agotar las reservas de folato (Shaw y col., 1989). Un estudio observó que en ratas alimentadas con una dieta con un contenido normal de folato, la administración del alcohol aumentaba los niveles intracolónicos de acetaldehído y los niveles de folato de la mucosa del colon se reducían significativamente (Homann y col., 2000), posiblemente debido a la rotura o escisión del folato por el acetaldehído (Salaspuro, 1996).

El nivel de folato también podría ser potencialmente perturbado por polimorfismos en el gen de la MTHFR y en otros genes implicados en el metabolismo del folato (Sharp y Little, 2004).

1.6.1 Polimorfismos en el gen *MTHFR*

El gen de la 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se localiza en 1p36.3. En humanos, el principal producto del gen *MTHFR* es una proteína catalíticamente activa de 77 kilodaltons, aunque también se ha observado en algunos tejidos una isoforma más pequeña de aproximadamente 70 kilodaltons (Rozen, 1997).

El polimorfismo más estudiado de la MTHFR es una transición en el exón 4 de una Citosina por una Timina en el nucleótido 677, que da lugar a la conversión de un residuo de Alanina en uno de Valina dentro del dominio catalítico NH₂-terminal (Keku y col., 2002). El alelo variante del polimorfismo C677T es comúnmente llamado "termolábil" porque la actividad de la enzima codificada se reduce a 37°C o más (Kang y col., 1991).

De este modo, la actividad de la MTHFR entre los homocigotos T/T es un 50-60% menor a 37°C y aproximadamente un 65% menor a 46°C, que en controles tratados de la misma manera (Rozen, 1997). Los heterocigotos están en un rango intermedio (un 35% menor aproximadamente). Las frecuencias del alelo T en poblaciones europea, asiática y africana son de 15-55%, 15-45% y 0-30%, respectivamente (Botto y Yang, 2000; Chango y col., 2000; Keku y col., 2002; Yin y col., 2004). El genotipo homocigoto variante T/T está relacionado con niveles reducidos de folato sérico (Friedman y col., 1999; Lievers y col., 2001; Parle-McDermott y col., 2006) y niveles más altos de homocisteína en plasma. Concretamente, estos individuos tienden a tener los niveles de homocisteína elevados en sangre si la ingesta de folato es insuficiente, pero niveles en sangre normales si su ingesta de folato es adecuada (Rozen, 1997).

El efecto de este polimorfismo en el riesgo de cáncer de pulmón se piensa que puede estar relacionado con el balance cuantitativo de 5,10-metilentetrahidrofolato y 5-metiltetrahidrofolato. Si el consumo de folato es insuficiente, el genotipo T/T podría inducir una depleción de 5-metiltetrahidrofolato y favorecer la hipometilación del ADN. Si el consumo es suficiente, la menor conversión de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metiltetrahidrofolato asociada al genotipo T/T podría prevenir la disminución de 5,10-metilentetrahidrofolato y en consecuencia la incorporación errónea de uracilo en el ADN, lo cual está asociado con frecuencia de rotura cromosómica (Kim, 2007). Individuos con genotipo homocigoto variante T/T presentan hipometilación del ADN en leucocitos de sangre periférica, un efecto que es especialmente pronunciado cuando los niveles de folato son bajos (Lathrop y col., 2000).

Además, la ingesta de algunos nutrientes implicados en la ruta metabólica del folato (por ejemplo, vitaminas B₆ y B₁₂ y metionina), así como el alcohol (un antagonista del folato), pueden modificar el efecto de los polimorfismos de la MTHFR en los niveles séricos de folato, afectando posiblemente al riesgo de cáncer (Bailey, 2003).

2. OBJETIVOS

Durante los últimos años se han descrito distintos polimorfismos genéticos en los genes que codifican enzimas que participan en el metabolismo del alcohol, el acetaldehído y el folato. Algunos de estos polimorfismos modifican la actividad enzimática y en otros casos modifican la actividad transcripcional de algunos de estos genes. Estos cambios se han asociado a una distinta susceptibilidad a desarrollar algunas enfermedades como el cáncer.

Por ello, en esta Tesis Doctoral se ha estudiado la contribución tanto del alcohol como de polimorfismos en genes implicados en el metabolismo del alcohol, acetaldehído y folato al riesgo de cáncer de pulmón. En concreto, los objetivos de esta tesis fueron:

- Analizar la relación del consumo de alcohol en el riesgo de cáncer de pulmón, así como la interacción alcohol-tabaco, alcohol-verduras y alcohol-frutas con el riesgo de cáncer de pulmón.
- Determinar la influencia de 8 polimorfismos en genes metabolizadores de alcohol, acetaldehído y folato en la incidencia de cáncer de pulmón mediante el genotipado de individuos control y pacientes con cáncer.
- Examinar la correlación entre los 8 polimorfismos en genes metabolizadores de alcohol, acetaldehído y folato junto con el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón.
- Estudiar la interacción entre los genes analizados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reactivos

Para la obtención de ADN a partir de células sanguíneas se utilizó una solución de lisis de eritrocitos (RBC: NH_4CO_3 1 mM, NH_4Cl 114 mM) y una solución de lisis de leucocitos (WCLB: Tris/HCl pH 7,5 1 mM, NaCl 5 mM, EDTA 1 mM). El resto de los productos empleados a lo largo de este trabajo fueron de calidad analítica y se adquirieron a distintas firmas suministradoras: Merck, Sigma, Scharlau, Applichem y Roche.

3.1.2 Muestras biológicas

Sangre. Para la obtención de ADN de cada participante se recogió una muestra de 30 ml de sangre en tubos de vacío con EDTA como anticoagulante, y siempre antes de iniciar el tratamiento terapéutico. Las muestras de sangre se recibieron en el laboratorio en las 5 horas siguientes a su extracción, donde se procesaron para la obtención de plasma y células sanguíneas. El plasma se congeló a -80°C para futuros análisis, mientras que a partir de las células sanguíneas se purificó el ADN genómico de cada paciente.

Enjuague bucal. Se recogió una muestra de 10 ml de enjuague bucal, que se centrifugó durante 15 min a $3.061\times g$, guardándose las células desprendidas a -80°C para la posterior extracción de ADN en caso de que fuera necesario.

Tejido tumoral. Las muestras de tumores frescos congelados a -150°C o fijados en parafina son recogidos y almacenados rutinariamente por el Banco de Tumores del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA). Este servicio también recoge y almacena tejidos sanos adyacentes después del estudio anatomopatológico. Este material biológico está disponible para futuras investigaciones que permitan evaluar nuevas hipótesis utilizando el tejido tumoral.

Uñas. Finalmente, se recogen y almacenan correctamente etiquetadas las uñas del dedo gordo del pie para evaluar la presencia de determinados compuestos, como metales pesados.

Durante todo el proceso de manipulación y almacenaje, las muestras biológicas fueron etiquetadas con un número de referencia interno para facilitar su seguimiento y su equivalencia con el número del historial clínico que se introdujo en una base de datos específicamente creada para este estudio. De esta manera todos los análisis posteriores de genotipado fueron realizados de forma anónima, sin que el investigador tuviese constancia de si la muestra a analizar pertenecía a un caso o a un control, hasta la finalización del estudio, lo que garantiza la total independencia de los resultados.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Diseño del estudio

El presente trabajo forma parte de otro estudio más amplio, denominado estudio CAPUA (Cáncer de Pulmón en Asturias), que se ha desarrollado en la Unidad de Epidemiología Molecular del Cáncer del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), en el que se analizan diversos aspectos de la susceptibilidad genética y factores de riesgo ambientales, ocupacionales y de estilos de vida, en relación con el cáncer de pulmón (http://www.unioviedo.es/Oncologia/index.php?option=com_content&view=article&id=71&Itemid=163&lang=es).

3.2.1.1 Sujetos de estudio

Los sujetos participantes fueron seleccionados entre pacientes de entre 30 y 85 años, diagnosticados por primera vez de cáncer de pulmón y residentes, durante al menos 6 meses, en las áreas de influencia de los hospitales de Gijón (Hospital de Cabueñes), Avilés (Hospital de San Agustín), Mieres (Hospital Álvarez Buylla) y Oviedo (Hospital Universitario Central de Asturias). Los casos fueron identificados durante el proceso diagnóstico en los Servicios de Neumología, Medicina interna, Anatomía Patológica y Oncología de los citados centros hospitalarios.

El contacto con los pacientes y su inclusión en el estudio se realizó durante su primera estancia hospitalaria. Posteriormente, el diagnóstico definitivo del caso vino dado por la información anatomopatológica. En el supuesto de que no existiera dicha

información, la inclusión o no del caso se realizó a través de un método de consenso con los especialistas participantes.

La exhaustividad del proceso de identificación y selección de pacientes con cáncer de pulmón durante el período de estudio, se verificó mediante revisión periódica de los registros de Anatomía Patológica de los hospitales participantes. A cada caso se le asignó un control apareado por hospital, género, edad (± 5 años) y residencia durante al menos los 6 últimos meses en el área sanitaria de referencia del hospital donde se diagnosticó el caso. La selección de los controles se llevó a cabo entre pacientes que ingresaron en el mismo hospital de cada caso para cirugía dentro de un amplio espectro de condiciones agudas no relacionadas con ningún factor de riesgo conocido de cáncer de pulmón (Anexo I). En el anexo I se adjunta la lista de patologías válidas para controles de nuestro estudio caso-control, con los Códigos de la Clasificación Internacional de Enfermedades, 9ª revisión (WHO.ICD-9).

3.2.1.2 Datos sociodemográficos y factores de riesgo

Tras solicitar consentimiento informado, previamente autorizado por el comité de ética de los distintos hospitales (Anexo II), un entrevistador entrenado llevó a cabo una entrevista personal con el caso o control, preferentemente durante la primera estancia hospitalaria del sujeto. Para ello se realizó un cuestionario estructurado e informatizado en el que se recogen los datos que se indican en la Tabla 2.

Tabla 2. Datos recogidos en el cuestionario

Datos sociodemográficos básicos	
Antecedentes familiares y patológicos de cáncer	
Posibles factores de riesgo	endógenos edad género
	medioambientales vivienda urbana o rural localización de la vivienda tipo de abastecimiento de agua
	estilo de vida educación clase social tabaquismo activo e involuntario (ETS) cuestionario de dieta prácticas de cocina y alimentación actividad física en tiempo de ocio
	ocupacionales profesión vida laboral historia de exposición ocupacional

3.2.1.3 Datos clínicos

Para la evaluación de los datos clínicos se recogió información sobre los síntomas, métodos diagnósticos, estadio tumoral, tipo histológico y grado de diferenciación del tumor, tratamiento y presencia de otras patologías concurrentes. La recogida de información, realizada por los neumólogos tras un entrenamiento previo, se llevó a cabo en un impreso estructurado diseñado específicamente para este estudio (IDC, Anexo III).

3.2.1.4 Tamaño de la muestra y poder estadístico del estudio

De acuerdo con los modelos de Breslow y Day, el tamaño de muestra analizado garantiza poder detectar las diferencias de riesgo siguientes, con nivel de significación igual a 0,05 y test de dos colas: para frecuencias alélicas de 0,43 (*ADH1C* y *MTHFR*) se podrían detectar OR mayores que 1,21 y menores que 0,82 con una potencia mayor del 80%; para frecuencias alélicas de 0,82 (*Arg48His ADH1B* y *DraI CYP2E1*) se podrían detectar OR mayores que 1,30 y menores que 0,79 con una potencia mayor del 80%; para frecuencias alélicas de 0,92 (*RsaI CYP2E1*) se podrían detectar OR mayores que 1,47 y menores que 0,72 con una potencia mayor del 80%; y para frecuencias alélicas de 0,99 (*Arg370Cys ADH1B* y *TaqI CYP2E1*) se podrían detectar OR mayores que 3,89 y menores que 0,20 con una potencia mayor del 80%.

3.2.1.5 Dieta

La sección de dieta del cuestionario (Anexo IV) valoraba la frecuencia de consumo y el tamaño habitual de la porción o ración de 127 ítems de alimentos (incluidas las bebidas alcohólicas), y se usó para estimar el consumo diario de alcohol y de las calorías. Las raciones estándar de vino tinto (125 ml), vino blanco (125 ml), cerveza (200 ml), jerez (50 ml), sidra (125 ml), licores dulces (30 ml), y coñac, ginebra, ron, wiski y vodka (40 ml) fueron calculadas a partir de las tablas de composición de los alimentos y contienen 13,25; 6,15; 3,06; 7,80; 7,40; y 14.25 gramos de etanol respectivamente. Como se informa en el cuestionario de frecuencia de alimentos, se ha calculado el consumo medio de alcohol durante los 5 años anteriores a la entrevista y los sujetos participantes se agruparon en cuatro categorías basadas en los tertiles del consumo de alcohol (ajustado por energía) entre los controles: no bebedores, <0,1 (categoría de referencia en el análisis); 0,1-9,9; 10-29.9; y ≥ 30 g/día.

Hemos usado un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de alimento (FFQ) de 101 ítems para evaluar la ingesta diaria habitual de alimentos y nutrientes (Anexo V). El FFQ es una versión modificada de un FFQ previo basado en el cuestionario de Harvard (Willett y col., 1985), y que se desarrolló y validó usando cuatro registros de 1 semana de la dieta en población adulta en Valencia. Los coeficientes de correlación de validez y reproducibilidad (ajustado por consumo de energía) oscilaron entre 0,38, para la reproducibilidad de los carotenoides, hasta 0,44 para la validez de la vitamina C (Vioque y Gonzalez, 1991; Vioque y col., 2007); este rango es similar al observado en otros cuestionarios establecidos de dieta (Willett, 1998; Henríquez-Sánchez y col., 2009). A los sujetos participantes en este estudio se les preguntó por la frecuencia media habitual con que consumían cada alimento durante los cinco años anteriores. El tamaño de las porciones para cada alimento se especificaba en el FFQ. El cuestionario contenía nueve posibles respuestas, que van desde “nunca o menos de una vez al mes” hasta “seis o más veces al día”. Los valores de los nutrientes se obtuvieron, principalmente, de las tablas de composición de los alimentos de las publicaciones del Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA National Nutrient Database for Standard Reference, 2010), así como de otras fuentes publicadas para la comida española y los tamaños de las porciones (Tablas del CESNID) (Palma y col., 2008). Para obtener, a partir de la ingesta de alimentos la ingesta diaria de nutrientes para cada individuo, se multiplicó la frecuencia de uso de cada alimento por la composición de nutrientes de la ración o

porción especificada en el FFQ y se sumaron las de todos los alimentos para obtener la ingesta total de cada nutriente.

3.2.1.6 Tabaco

Los sujetos participantes fueron definidos como no fumadores si no habían fumado más de 100 cigarrillos a lo largo de toda su vida; el resto fueron definidos como fumadores. Los fumadores se clasificaron a su vez en fumadores actuales, en los que se incluyen los sujetos participantes que durante los 6 meses previos a la entrevista o más, han estado fumado al menos un cigarrillo al día. Los individuos que habían fumado regularmente pero que habían dejado de fumar al menos un año antes de la entrevista, fueron definidos como ex-fumadores; aquellos individuos que habían dejado de fumar menos de un año antes de la entrevista, fueron incluidos en fumadores actuales.

A los fumadores se les preguntó el tiempo, en años, que han estado fumando al menos un cigarrillo al día y cuántos cigarrillos solían fumar diariamente. La intensidad del hábito tabáquico se ha definido posteriormente en paquetes/año (PY), y se calcula multiplicando el número de paquetes de cigarrillos fumados al día por el número de años que el sujeto ha estado fumando esa cantidad de tabaco. Los sujetos se clasificaron como fumadores leves ($<37PY$) o fumadores severos ($\geq 37PY$), basándonos en la media del consumo de la distribución de los paquetes/año del grupo control.

3.2.2 Análisis estadístico

Toda la información se organiza e introduce en tres bases de datos que incluyen la información referente a los factores de riesgo y confusores, datos clínicos y polimorfismos genéticos.

Antes del análisis, todas las ingestas de nutrientes y grupos de alimentos fueron transformados logarítmicamente (base natural) para mejorar su normalidad. Posteriormente se estimaron las ingestas de nutrientes ajustadas por ingesta calórica total. Para ello se utilizó el método de los residuos denominado también de Willett, dónde cada nutriente se ajusta en un modelo de regresión lineal con las calorías totales y los residuos se añaden a la ingesta media del nutriente en la población de estudio (Willett y col., 1985). Se calcularon también cuartiles de ingesta para alimentos y nutrientes

ajustados por calorías totales usando la distribución de los controles. De acuerdo con esto, las categorías para frutas, verduras y folato se basan en los cuartiles del grupo control correspondiente.

Para el análisis estadístico se usaron los métodos estadísticos estándares del estudio caso-control. En primer lugar se comprueba que la población está en equilibrio Hardy-Weinberg y se describen los individuos en estudio empleando test χ^2 de homogeneidad e independencia. Se incluye el estadístico de Mantel-Haenszel para estudiar las posibles asociaciones de la enfermedad en estudio con los diferentes factores de riesgo ambientales y polimorfismos genéticos, así como posibles efectos de confusión haciendo análisis estratificados. Para la comparación de variables continuas entre distintos grupos de individuos se usaron los test de Lilliefors, Levene y el test t para comprobar normalidad, homocedasticidad e igualdad de medias en caso de normalidad, en otro caso se utilizaron los test no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis según correspondiera.

Una vez explorados los datos, para el análisis multivariante se empleó el método de regresión logística no condicionada (Kleinbaum y Klein, 2002). De esta manera se hallaron las estimaciones de los parámetros que permitían construir el modelo matemático que mejor explicaba la variable enfermedad en estudio en función de los datos de que se disponía. Posteriormente, se utilizaron los test LR y Wald para estudiar las variables que entraban o salían del modelo, valorando confusión y estudiando si existía interacción entre distintos factores. También se calcularon las estimaciones puntuales e intervalos de confianza de las ORs para las distintas variables de interés, teniendo en cuenta los ajustes oportunos, y se estudió – a través de test de bondad de ajuste (test Hosmer-Lemeshow) – cómo de efectivo es el modelo encontrado en cuanto a la descripción de la variable de salida en estudio.

Se analizaron interacciones simples gen-gen con un modelo de regresión logística que incluye un término de interacción, variables de exposición y posibles confusoras. Para realizar el análisis de las interacciones gen-gen, se combinan y clasifican los genotipos de los genes dos a dos en cuatro categorías, teniendo en cuenta un modelo de herencia dominante: dos alelos de no riesgo (el grupo de referencia); alelo de no riesgo para el primer gen y cualquier alelo de riesgo para el segundo; cualquier alelo de riesgo para el primer gen y alelo de no riesgo para el segundo; y, por último, dos alelos de

riesgo. Para el gen *ADH1C* ha sido seleccionado como supuesto alelo de alto riesgo el alelo Ile; en el caso de Arg48His en *ADH1B* es el alelo His; para Arg370Cys en *ADH1B*, el alelo Cys; en el caso del gen *CYP2E1*: para el polimorfismo *TaqI*, el alelo C; para el polimorfismo *RsaI*, el alelo c2; y para el polimorfismo *DraI*, el alelo C; finalmente, para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR*, el supuesto alelo de alto riesgo seleccionado es el alelo T.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico STATA 12.1.

3.2.3 Biología molecular

3.2.3.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico a partir de una muestra de sangre se realizó mediante técnicas estándar de Biología Molecular (Sambrook y col., 1989). Básicamente, las células sanguíneas se aislaron mediante centrifugación de la muestra de sangre a 2.465xg durante 10min. Para lisar los eritrocitos, el precipitado se resuspendió en solución de lisis de eritrocitos (RBC: NH_4CO_3 1 mM, NH_4Cl 114 mM), se incubó en hielo durante 20 min, y se centrifugó durante 10 min a 2.465xg, eliminando el sobrenadante. Este paso se repitió dos veces, y a continuación el precipitado, formado por leucocitos, se resuspendió en 10 ml de solución de lisis de leucocitos WCLB (Tris/HCl pH 7,5 1mM, NaCl 5 mM, EDTA 1 mM), 1 ml de SDS al 10%, y 50 μl de proteinasa K (15,6 mg/ml), y se incubó 16 h a 55°C. A la mezcla de lisis se le añadieron 4 ml de NaCl 6M y se agitó energéticamente durante 15 s, seguido de centrifugación a 2.465xg durante 15 min (Miller y col., 1988). El sobrenadante se transfirió a un tubo de 50 ml con 2 volúmenes de etanol absoluto (20 ml) para precipitar el ADN genómico. El ADN precipitado se recogió en un tubo de 1,5 ml y se lavó con etanol al 70%. Finalmente, el ADN se resuspendió en agua mili-Q a una concentración final de 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, guardándose a -20°C. Durante todo el proceso de aislamiento de ADN se trabajó con puntas con filtro y se tomaron todas las medidas posibles para evitar posibles contaminaciones que pudieran afectar al estudio. Para la extracción de ADN genómico de células procedentes del enjuague bucal, éstas se resuspendieron en 1 ml de solución WCLB, 100 μl de SDS (10%) y 4 μl de proteinasa K, y se trataron siguiendo el mismo protocolo que para las células sanguíneas, aunque modificando los volúmenes para ajustarlos a la cantidad de WCLB inicial. La

concentración de ADN se determinó mediante absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV-160 (Shimadzu).

3.2.3.2 Genotipado de SNPs mediante la tecnología Sequenom MassArray (iPLEX GOLD)

En este trabajo se han estudiado los siguientes polimorfismos: Ile349Val (rs698) en el gen *ADH1C*; Arg48His (rs1229984) y Arg370Cys (rs2066702), ambos en el gen *ADH1B*; Glu504Lys (rs671) en el gen *ALDH2*; *RsaI* (rs2031920), *DraI* (rs6413432) y *TaqI* (rs2070676), todos en el gen *CYP2E1* y por último el polimorfismo C677T (rs1801133) del gen *MTHFR*.

A continuación se describe detalladamente la tecnología (Sequenom MassArray (iPLEX GOLD), llevada a cabo en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN) – Nodo Santiago, mediante la cual se han genotipado los polimorfismos citados anteriormente:

Diseño de los ensayos:

El primer paso en el diseño de cualquier proyecto de genotipado es la elección de los marcadores a estudio. Salvo que se empiece a partir de un grupo de variantes ya publicadas, ha de realizarse una búsqueda en los recursos disponibles, las bases de datos de dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism database - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), el proyecto 1000 Genomas, base de datos de CNVs (Copy Number Variation) (Database of Genomic Variants - <http://projects.tcag.ca/variation/>), bases de datos de enfermedades, etc. Los criterios de selección de un SNV (Single Nucleotide Variant) pueden ser la frecuencia, la proximidad a genes, la localización en regiones codificantes, su funcionalidad, etc. Existe una gran flexibilidad en el diseño porque los oligonucleótidos que se emplean son sencillos, así es posible analizar variantes en cualquier especie siempre que se tenga información de unas cien pares de bases en torno a la posición de interés.

Por las características de la química y el sistema de detección con MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight), se pueden analizar variaciones de una única base, ya sean cambios de dos alelos o más, e inserciones y deleciones de hasta 40 pares de bases. Las secuencias deben contener la variante que

queremos analizar indicada entre corchetes, [A/G] por ejemplo para un cambio de A (Adenina) a G (Guanina), si se trata de deleciones [n/-] e inserciones como [-/n], siendo “n” la secuencia que se pierde o gana hasta 40 pares de bases. El límite de tamaño está marcado por el rango donde se pueden leer los productos de extensión, entre 4.500 y 9.000 Da. Además, se pueden hacer combinaciones de ensayos para analizar grandes deleciones, por ejemplo, diseñando cebadores a ambos lados de la región y considerando posiciones no polimórficas, de manera que lo que obtenemos es señal de extensión siempre para un único alelo. Así detectamos si se produce o no amplificación, y con ello la presencia o ausencia de la deleción.

En el caso de querer estudiar variantes que se encuentran depositadas en dbSNP, se puede obtener directamente la secuencia en formato FASTA. La segunda fase consiste en anotar dicha secuencia indicando las posiciones donde se encuentran otras variantes, lo que se conoce como SNVs secundarios y las secuencias repetitivas, por ejemplo elementos Alu. Este paso es muy importante ya que debemos evitar diseñar los cebadores sobre estas posiciones polimórficas, ya que estaríamos alterando la eficacia de las reacciones; en este caso se utilizaría el software ProxSNP disponible a través del portal Mysequenom (MySequenom s.f.). También se pueden anotar las secuencias manualmente; la ventaja es que podemos descartar aquellos SNVs que no estén validados o que sean monomórficos en nuestra población de estudio.

Una vez tenemos todas las secuencias preparadas, se usa el software PreEXtend, también en disponible en Mysequenom, para identificar las regiones óptimas para los cebadores de PCR y hacer una comparación con todo el genoma, de manera que sólo se produzca una amplificación específica de la región próxima a la variante. En caso de que existan posibles amplificaciones inespecíficas el software rechaza la secuencia. En la secuencia se indican las regiones seleccionadas para los cebadores de PCR con letras mayúsculas y se bloquea el diseño en el resto de la secuencia mediante el uso de letras minúsculas.

A continuación se realiza el diseño de los ensayos empleando el software Assay design v4. Para usar el software de diseño las secuencias deben ser procesadas en un determinado formato de fichero denominado SNP Group, que es un fichero txt con dos columnas, una con el código del SNV (SNP_ID) y otra con la secuencia (Sequence). Las

secuencias deben incluir la variante que nos interesa estudiar entre corchetes como se indicó anteriormente.

Existen varias opciones de diseño donde se pueden seleccionar el número máximo de SNVs por ensayo, el tipo de cola añadida a los cebadores, el contenido GC (Guanina-Citosina), la T_m , el tipo de variantes que queremos estudiar (indels (IN-DEL, inserción-delección), SNVs no bialélicos, regiones con múltiples SNVs, etc). Además también se pueden utilizar ensayos ya optimizados para rediseño o añadir nuevas variantes sobre diseños ya existentes.

Para cada variante el software diseña tres oligonucleótidos, dos de PCR y un oligonucleótido de extensión. En el diseño de los cebadores se tiene en cuenta la T_m (temperatura de fusión), temperatura de hibridación, existiendo unos valores mínimos que deben ser superados. Además no se deben diseñar cebadores sobre una región que contenga otra variante, y hay que tener en cuenta la posibilidad de que se formen estructuras como horquillas, homodímeros y heterodímeros, y el contenido de regiones poliG. Los valores límite permitidos para estos criterios varían según se estén diseñando cebadores de PCR o de extensión.

Los cebadores de PCR deben estar al menos a 6 pares de bases del SNV y llevan añadida una cola de 10 pares de bases en el extremo 5' que, además de espaciar los cebadores de PCR en el espectro fuera del rango de lectura, unifican las condiciones de la PCR multiplex mejorando así la eficacia del genotipado (Van den Boom, 2004). Las secuencias de los cebadores de PCR utilizados para los polimorfismos estudiados en esta tesis se encuentran recogidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los cebadores de los polimorfismos analizados

GEN	POLIMORFISMO	RS	CEBADORES PCR
<i>ADH1C</i>	Ile349Val	698	(D) ACGTTGGATGAGAGCGAAGCAGGTCAAATC (R) ACGTTGGATGAAGAAGTTTTCACTGGATGC
<i>ADH1B</i>	Arg48His	1229984	(D) ACGTTGGATGTTGCCACTAACCACGTGGTC (R) ACGTTGGATGCTGAATCTGAACAGCTTCTC
<i>ADH1B</i>	Arg370Cys	2066702	(D) ACGTTGGATGGCATGTGGGTTGTCTAAATG (R) ACGTTGGATGCTCTATTGCCTCAAAACGTC
<i>CYP2E1</i>	<i>RsaI</i>	2031920	(D) ACGTTGGATGCATTTCTCATCATATTTTC (R) ACGTTGGATGGTTCTTAATTCATAGTTGC
<i>CYP2E1</i>	<i>DraI</i>	6413432	(D) ACGTTGGATGCTGTGCCAGCCAAAATAAT (R) ACGTTGGATGCAAGTAACTGGGCCACAGGT
<i>CYP2E1</i>	<i>TaqI</i>	2070676	(D) ACGTTGGATGTTATGCTATATAGGATAGTA (R) ACGTTGGATGACCCCTGACTGCTTCTATC
<i>ALDH2</i>	Glu504Lys	671	(D) ACGTTGGATGAGTTGGGCGAGTACGGGCTG (R) ACGTTGGATGCAGGTCCACACTCACAGTT
<i>MTHFR</i>	C677T	1801133	(D) ACGTTGGATGACCTGAAGCACTTGAAGGAG (R) ACGTTGGATGGAAAAGCTGCGTGATGATG

En el caso de los oligonucleótidos de extensión, deben hibridar adyacentes al sitio polimórfico, ya sea en la hebra forward o reverse. Los oligonucleótidos de extensión utilizados en nuestro caso se describen en la Tabla 4. Además de las propiedades anteriormente citadas (T_m , contenido GC, etc.), el diseño de la sonda depende del producto de extensión generado, de manera que sea posible interpretar el resultado y determinar los alelos. Así, un cambio como una deleción de una adenina en un región con adeninas, A[A-]A, no permite el diseño de un cebador de extensión válido. También se considera si la diferencia de masa correspondiente a los alelos está próxima a la de los aductos de Na^+ (+22 Da) o K^+ (+ 38 Da); una opción para evitar esto es fijar una separación espacial mínima entre los picos de 30 Da.

El último paso en el diseño de ensayos es PlexExtend, y permite validar los diseños multiplex en todo el genoma y evitar amplificaciones no deseadas por la unión al azar de los oligonucleótidos presentes en la multiplex (Oeth, 2009).

El software también permite diseñar cebadores de PCR para regiones con múltiples SNVs, de manera que en una misma reacción se pueden estudiar SNVs próximos.

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos de extensión de los polimorfismos analizados

GEN	POLIMORFISMO	OLIGONUCLEÓTIDO EXTENSIÓN (DIRECCIÓN OLIGONUCLEÓTIDO)	ALELO 1	OLIGONUCLEÓTIDO EXTENSIÓN (EXTENDIDO ALELO 1)	ALELO 2	OLIGONUCLEÓTIDO EXTENSIÓN (EXTENDIDO ALELO 2)
ADH1C	Ile349Val	(D) TTCACTGGATGCATTAATAACAAT	A	TTCACTGGATGCATTAATAACAATA	G	TTCACTGGATGCATTAATAACAATG
ADH1B	Arg48His	(D) GGTGGCTGTAGGAATCTGTC	A	GGTGGCTGTAGGAATCTGTCA	G	GGTGGCTGTAGGAATCTGTGCG
ADH1B	Arg370Cys	(R) gTGCCTCAAAAACGTCAGGACGGTAC	T	gTGCCTCAAAAACGTCAGGACGGTACA	C	gTGCCTCAAAAACGTCAGGACGGTACG
CYP2E1	RsaI	(R) TTCTTAATTCATAGGTGCAATTTT	T	TTCTTAATTCATAGGTGCAATTTTA	C	TTCTTAATTCATAGGTGCAATTTTG
CYP2E1	DraI	(D) ccCCACACCCAGCTGATTAATAAAT	A	ccCCACACCCAGCTGATTAATAAATTA	T	ccCCACACCCAGCTGATTAATAAATTT
CYP2E1	TaqI	(D) gACTAAGCAACTCCTTCAACT	C	gACTAAGCAACTCCTTCAACTC	G	gACTAAGCAACTCCTTCAACTG
ALDH2	Glu504Lys	(R) CACTCACAGTTTTCACTT	G	CACTCACAGTTTTCACTTC	A	CACTCACAGTTTTCACTTT
MTHFR	C67T	(R) aTGGGTGATGATGAAATCG	T	aTGGGTGATGATGAAATCGA	C	aTGGGTGATGATGAAATCGG

Procesado de las muestras:

Una vez finalizado el proceso de diseño, tenemos un fichero Excel con los códigos de las variantes, las secuencias de los cebadores de PCR, valores como T_m , contenido en GC, longitud del fragmento de PCR, las secuencias de los cebadores de extensión, su masa en Daltons y los productos de la extensión de cada alelo con su masa correspondiente. En este punto se puede modificar el nombre de los alelos, esto es de gran utilidad si se trabaja con mutaciones o indels.

Este fichero se importa en la base de datos de Sequenom, de manera que se puedan traducir los picos de los espectros en los correspondientes alelos. A partir de aquí se piden los oligonucleótidos, tres por variante, dos de PCR a 100 μM y uno de extensión a 400 μM . Para estos últimos es necesario preparar y optimizar la mezcla de oligonucleótidos, ya que aquellos de mayor masa generarán unos picos de menor intensidad por las propias condiciones de la espectrometría. Una característica del sistema de espectrometría de masas MALDI-TOF es que existe una relación inversa entre el ratio ruido-síñal y el incremento en la masa del analito. Cuanto mayor es el producto de extensión menor el ratio ruido-síñal. Así se ajusta la concentración de los cebadores según su masa, aumentando a medida que se incrementa la masa. Para comprobar que los cebadores están equilibrados se usa el equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF para leer 1 μL de mezcla de cebadores en 15 μL de agua desionizada; de esta forma podemos saber si alguno de los cebadores tienen una concentración menor de la deseada.

El primer paso del proceso de genotipado es amplificar mediante una PCR convencional la región donde está el SNV, para cada variante se diseñan dos cebadores de PCR que amplifican una región de unos 100 pares de bases. Las reacciones no son individuales si no que, en cada una, podemos analizar simultáneamente entre 1 y 36 SNVs, denominadas reacciones multiplex, gracias al diseño de cebadores de PCR compatibles.

Para el proceso de amplificación, se coge 1 μL de ADN y la mezcla detallada en la Tabla 5 que se muestra a continuación:

Tabla 5. Mezcla de reactivos utilizada para el proceso de amplificación

Reactivo	Conc. en 5µL	Volumen (1 reacción)	Volumen (384 reacciones)
Agua (calidad HPLC)	NC	1,850 µL	980,38 µL
Tampón PCR (10x)(15mM MgCl ₂)	1,25x	0,625 µL	331,3 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,65 mM	0,325 µL	172,3 µL
Mezcla dNTP (25mM cada uno)	500 µM	0,100 µL	53,0 µL
Mezcla oligonucleótido (500 nM cada uno)	100 nM	1,000 µL	530,0 µL
HotStarTaq® (5 U/ µL)	0,5 U/reacción	0,100 µL	53,0 µL
Volumen Total:		4,000 µL	2120,0 µL

Preparar el termociclador para la placa microtiter de 384 pocillos como sigue:

94°C durante 15 minutos
 94°C durante 20 segundos
 56°C durante 30 segundos
 72°C durante un minuto
 72°C durante 3 minutos
 4°C indefinido o hasta el siguiente paso

} 45 Ciclos

Tras esta amplificación se realiza una purificación con el enzima SAP (shrimp alkaline phosphatase) para eliminar los dNTPs (Deoxinucleótidos trifosfato) empleados en el paso anterior (Tabla 6).

Tabla 6. Mezcla de reactivos utilizada para el proceso de purificación

Reactivo	Volumen (1 reacción)	Volumen (384 reacciones)
Agua (calidad HPLC)	1,53 µL	810,9 µL
Tampón SAP (10x)	0,17 µL	90,1 µL
Enzima SAP (1,7 U/ µL)	0,30 µL	159,0 µL
Volumen Total	2,00 µL	1060,0 µL

Seguidamente, preparamos el termociclador como se detalla a continuación:

1. 37°C durante 40 minutos
2. 85°C durante 5 minutos
3. 4°C indefinido o hasta el siguiente paso

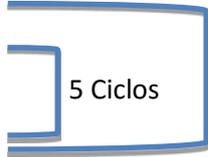
A continuación se realiza la reacción de extensión SBE (Single Base Extension); para ello se diseña un tercer cebador por variante que hibrida adyacente a la base polimórfica y se añade a este cebador la base complementaria al SNV en 3'. En este paso cada cebador incrementa su longitud un nucleótido, lo que implica un cambio en la masa del cebador; esto nos permite identificar mediante espectrometría de masas qué nucleótido se ha incorporado (Tabla 7).

Tabla 7. Mezcla de reactivos utilizada para la reacción de extensión

Reactivo	Conc. en 9µL	Volumen (1 reacción)	Volumen (384 reacciones)
Agua (calidad HPLC)	NC	0,7395 µL	391,97 µL
Tampón Plus iPLEX (10x)	0,222X	0,200 µL	106,00 µL
Mezcla final iPLEX	0,5x	0,100 µL	53,00 µL
Mezcla oligonucleótidos (7 µM: 14 µM)*	0,624 µM: 1,5 µM	0,94 µL	498,12 µL
Enzima iPLEX	0,5x	0,0205 µL	10,87 µL
Volumen Total:		2,000 µL	1060,0 µL
* 7 µM y 14 µM pone de manifiesto la concentración duplicada de los oligonucleótidos de masa elevada.			

El siguiente paso es preparar el termociclador de la siguiente forma:

94°C durante 30 segundos
 94°C durante 5 segundos
 52°C durante 5 segundos
 80°C durante 5 segundos
 72°C durante 3 minutos
 4°C indefinido o hasta el siguiente paso



Posteriormente se preparan estos productos de extensión para la espectrometría de masas, para ello se incorpora una resina de intercambio catiónico que va a eliminar todas

las sales presentes, principalmente el Na⁺ y el K⁺, ya que generan artefactos en los espectros, y se añade agua desionizada. Los productos finales se transfieren mediante el robot Nanodispenser (Samsung) a un chip, que tiene 384 posiciones, con la matriz, ácido 3-HPA (ácido hidroxipicolínico); el volumen que se puntea en cada punto con matriz es de 15 nL. Estos chips se leen en el espectrómetro de masas MALDI-TOF, Autoflex (Bruker Daltonics). Un láser ultravioleta, con una longitud de onda de 337nm, irradia cada punto transfiriendo energía, lo que genera una nube de iones que es acelerada a través de un campo eléctrico. Posteriormente los iones se dirigen hacia el detector en una zona libre de carga. El ratio m/z (masa/carga) se calcula a partir del tiempo de vuelo y se obtiene un espectro de masas para cada reacción multiplex, empleando el software SpectroAcquire. Para cada SNV tenemos tres posibles picos, uno correspondiente al cebador de extensión en aquellos casos donde no haya funcionado la reacción, otro si el cebador se ha extendido para el nucleótido de menor masa y el tercero si el cebador ha incorporado el nucleótido de masa mayor (Buetow KH, 2001). Los espectros son revisados manualmente empleando el software Typer Analyzer v4.

Como control de calidad se revisan los clúster para cada SNV y se eliminan los SNVs con bajo porcentaje de genotipado o que no están en equilibrio HW y se descartan las muestras que tienen un porcentaje de genotipado bajo o que muestran peor calidad. También se comprueba la consistencia en los resultados para muestras repetidas, dentro de la misma placa y entre placas. Además, en cada chip se incluye un trío de muestras Coriell, para las que existen datos publicados y con las que se pueden comparar los resultados obtenidos y revisar la correcta transmisión de alelos de padres a hijos, para comprobar la eficacia del genotipado.

4. RESULTADOS

4.1 DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Hasta el 30 de octubre de 2010 han sido registrados en la base de datos 1978 individuos (1039 casos y 939 controles), de los que 1839, el 92,97%, son elegibles (969 casos y 870 controles) y el resto, 141 individuos (7,03%), son no elegibles por diversas causas, entre las que podemos destacar: no existir confirmación diagnóstica de 65 individuos (46,10%), reasignación de 58 individuos (41,13%), el lugar de residencia en 10 pacientes (7,09%) u 8 individuos por otras causas (5,67%).

De los 1839 individuos elegibles, un total de 1724 (93,74%), participan en el estudio, de los cuales 880 son casos (780 hombres y 100 mujeres) y 844 son controles (727 hombres y 117 mujeres) (Figura 6).

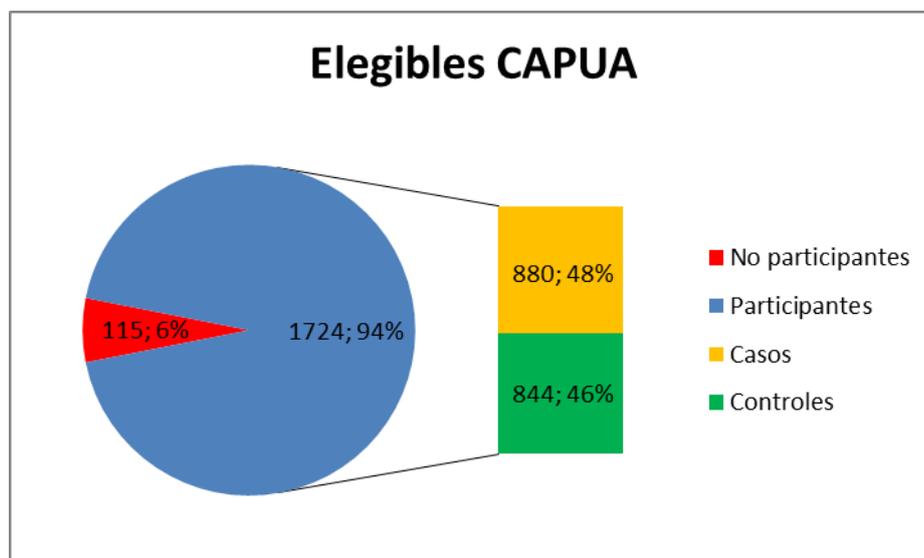


Figura 6: Participación en el estudio. Porcentaje de no participantes (6%) y de participantes (94%) (48% casos y 46% controles) en el estudio CAPUA.

El resto de los individuos no participantes 115, que constituyen el 6,26% de los elegibles, son eliminados por diferentes motivos: no dan razón (59,13%), gravedad de la enfermedad (17,39%), fallecimiento (6,96%), dado de alta sin consentimiento (6,09%), mentalmente incapacitado (2,61%), problemas de audición/habla (2,61%), cree que la entrevista le ocupará demasiado tiempo (0,87%), confidencialidad (0,87%) y por otros motivos (3,48%).

De los individuos participantes en el estudio se recogieron muestras biológicas de un total de 1703 (98,78%), de los cuales 875 son casos (51,38%) y 828 controles (48,62%). Se conserva solo sangre de 583 casos (66,63%) y de 570 controles (68,84%) y sólo enjuague de 17 casos (1,94%) y 35 controles (4,23%), y sangre y enjuague de 272 casos (31,09%) y 219 controles (26,45%). Excluyendo a los pacientes para los que no se han podido recoger muestras biológicas, 21 (1,22%) y los que tienen la entrevista incompleta, 7 (0,49%), se han incluido un total de 1703 individuos en este estudio (98,38%) que tienen información completa y muestras biológicas, de los cuales 875 son casos (51,38%) y 828 controles (48,62%).

Como ya se mencionó anteriormente, el estudio CAPUA es un estudio caso-control de base hospitalaria. En la presente tesis se han analizado los genotipos de los distintos genes de metabolización del alcohol, acetaldehído y folato en 877 casos (778 hombres y 99 mujeres) y 840 controles (723 hombres y 117 mujeres) recogidos en el estudio CAPUA.

Las características de los individuos participantes en el estudio tales como edad, género, hábito tabáquico, consumo de alcohol, calorías, ingesta de verduras, ingesta de frutas, antecedentes familiares de cáncer y tipo histológico para los casos, son recogidos en la Tabla 8. Se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en cuanto a distribución del género, pero si existen en la distribución de la edad. Al analizar los diferentes factores de riesgo en la población sometida a estudio, en cuanto al hábito tabáquico observamos que solo el 6,4% de los casos son no fumadores frente al 29,2% de los controles. Por tanto, el porcentaje de fumadores es del 94,6% en casos y del 70,8% en controles. Así mismo, la intensidad con la que fuman es también mayor en los casos, 61,81 paquetes/año (PY) frente a 36,13 paquetes/año en los controles ($p < 0,001$). Dentro de los fumadores hemos diferenciado entre ex-fumadores (desde hace más de un año) y fumadores actuales (incluye exfumadores desde hace menos de un año). Dentro de los ex-fumadores el 42,1% son casos y el 42,9% controles, en cuanto a los fumadores actuales la diferencia es notable, puesto que el 51,5% de los casos son fumadores actuales, frente al 27,7% de los controles.

En cuanto al consumo de alcohol, la media del consumo de alcohol (g/día) es muy similar en casos y controles (27,58% vs, 23,96%) ($p = 0,082$). Por el contrario, existen diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles en la media de

consumo de verduras (g/día), frutas (g/día) y calorías (kcal/día) (123,29 vs, 156,34; 242,19 vs, 268,96; 2404,98 vs, 2275,73), respectivamente.

El porcentaje de individuos con antecedentes familiares de cáncer de pulmón es mayor en los casos que en los controles (15,8% vs, 10%).

Por último se determinó el tipo histológico para 874 de los 877 casos (en los 3 individuos restantes no se pudo determinar), encontrando que el 40,3% presentaban carcinoma epidermoide, el 30,6% adenocarcinoma, el 17,3% microcítico, el 6,1% de células grandes y el 2,9% indiferenciado.

Se ha evaluado el consumo de alcohol en pacientes con cáncer de pulmón y controles con el objetivo de valorar su asociación con el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, así como su posible interacción con el tabaco y con la ingesta de verduras y frutas. También se ha determinado la frecuencia de 8 polimorfismos en 5 genes implicados en el metabolismo del alcohol (*ADH1C* Ile349Val, *ADH1B* Arg48His, *ADH1B* Arg370Cys, *CYP2E1* RsaI, *CYP2E1* TaqI, *CYP2E1* DraI), acetaldehído (*ALDH2* Glu504Lys) y folato (*MTHFR* C677T) en pacientes con cáncer de pulmón y controles con el objeto de evaluar su asociación con el riesgo o susceptibilidad genética a desarrollar cáncer de pulmón, así como su posible asociación con el consumo de alcohol. La distribución de los genotipos para todos los SNPs estudiados es consistente con el equilibrio Hardy-Weinberg, excepto para el polimorfismo Glu504Lys en el gen *ALDH2*.

Tabla 8. Distribución de los casos de cáncer de pulmón y controles del estudio

Variable	Casos (n=877) n (51,07%)	Controles (n=840) n (48,93%)	p ^a
Género			
Hombre	778 (88,71)	723 (86,07)	
Mujer	99 (11,29)	117 (13,93)	0,099
Edad (años), media (Desv. típ.)	66,11 (10,6)	64,46 (11,08)	0,002
Paquetes año (PY), media (Desv. típ.)	61,81 (36,07)	36,13 (30,33)	<0,001
Nunca	56 (6,39)	245 (29,24)	
<37	186 (21,23)	359 (42,84)	
≥37	634 (72,37)	234 (27,92)	<0,001
Hábito tabáquico			
No fumador	56 (6,39)	245 (29,17)	
Fumador	821 (93,61)	595 (70,83)	<0,001
Ex-fumador	368 (42,11)	358 (42,93)	
Fumador actual	450 (51,49)	231 (27,70)	<0,001
Consumo de alcohol (g/día)			
Media (Desv. típ.)	27,58 (44,62)	23,96 (40,68)	
No bebedor (<0,1)	129 (21,94)	136 (21,12)	
0,1-9,9	137 (23,30)	204 (31,68)	
10-29,9	146 (24,83)	143 (22,20)	
≥30	176 (29,93)	161 (25,00)	0,009
Calorías			
Media (Desv. típ.)	2404,98 (844,50)	2275,73 (698,03)	0,033
Ingesta de verduras (g/día)			
Media (Desv. típ.)	123,29 (102,82)	156,34 (138,81)	<0,001
<67,15	200 (34,01)	161 (25,00)	
67,15-116,65	164 (27,89)	161 (25,00)	
116,65-200,23	122 (20,75)	161 (25,00)	
>200,23	102 (17,35)	161 (25,00)	<0,001
Ingesta de frutas (g/día)			
Media (Desv. típ.)	242,19 (212,3)	268,96 (202,18)	0,001
<115,76	206 (35,03)	161 (25,00)	
115,76-233,13	146 (24,83)	161 (25,00)	
233,13-375,46	97 (16,50)	161 (25,00)	
>375,46	139 (23,64)	161 (25,00)	0,024
Antecedentes familiares de cáncer			
No	486 (84,23)	496 (90,02)	
Cáncer de pulmón	91 (15,77)	55 (9,98)	0,004
Tipo histológico			
Epidermoide	352 (40,27)		
Adenocarcinoma	267 (30,55)		
Microcítico	151 (17,28)		
Células grandes	53 (6,06)		
Indiferenciado	25 (2,86)		
Otros	12 (1,37)		
Diagnóstico clínico	14 (1,60)		

^a test Chi-cuadrado (variables categóricas), test Mann-Whitney (variables continuas)

4.2 ANÁLISIS DE ALCOHOL Y CÁNCER DE PULMÓN

En cuanto a la posible asociación entre el consumo de alcohol y cáncer de pulmón, observamos un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón casi estadísticamente significativo en la categoría de consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día (OR ajustada = 0,71; IC 95% = 0,48-1,06). Por otro lado, parece existir un aumento del riesgo de dicha neoplasia en la categoría de mayor consumo de alcohol (≥ 30 g/día), aunque dicha asociación no es estadísticamente significativa (OR ajustada = 1,21; IC 95% = 0,83-1,81) (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis del consumo de alcohol y riesgo de cáncer de pulmón

Alcohol (g/día)	Casos/Controles	OR cruda	OR ajustada ^a [IC 95%]
No bebedores (<0,1)	129/136	1,00	1,00
0,1-9,9	137/204	0,71 [0,51-0,98]	0,71 [0,48-1,06]
10-29,9	146/143	1,08 [0,77-1,50]	1,02 [0,68-1,52]
≥ 30	176/161	1,15 [0,83-1,59]	1,21 [0,83-1,81]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

4.3 ANÁLISIS DE INTERACCIONES

4.3.1 Análisis de interacción alcohol-tabaco

Existe una clara interacción entre el consumo de alcohol y el tabaco, siendo esta interacción más clara en la categoría de mayor consumo de tabaco (≥ 37 paquetes/año), de modo que un consumo de tabaco ≥ 37 paquetes/año aumenta el riesgo de cáncer de pulmón 4 veces si el consumo de alcohol es de 0,1-9,9 g/día (OR ajustada = 4,09; IC 95% = 1,88-8,88), 23 veces si el consumo de alcohol está entre 10-29,9 g/día (OR ajustada = 23,15; IC 95% = 10,68-50,18) y en 14 veces si el consumo de alcohol es ≥ 30 g/día (OR ajustada = 14,54; IC 95% = 6,76-31,29) (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de interacción entre el consumo de alcohol y el tabaco y el riesgo de cáncer de pulmón

Alcohol (g/día)	No fumador		<37 paquetes/año		≥37 paquetes/año	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
No bebedores (<0,1)	20/63	1,00	23/41	1,00	86/32	1,00
0,1-9,9	11/62	0,74 [0,31-1,77]	38/96	3,59 [1,62-7,98]	88/46	4,09 [1,88-8,88]
10-29,9	7/34	1,01 [0,37-2,77]	29/66	2,49 [1,19-5,18]	109/42	23,15 [10,68-50,18]
≥30	2/32	0,47 [0,10-2,24]	35/80	3,38 [1,53-7,46]	139/49	14,54 [6,76-31,29]

^aAjustada por edad, género, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

4.3.2 Análisis de interacción alcohol-verduras

Existe una interacción entre un consumo de verduras ≥116.65 g/día y el consumo de alcohol, de forma que disminuye el riesgo de cáncer de pulmón en todas las categorías de consumo de alcohol, aunque dicha interacción sólo es estadísticamente significativa para un de consumo de alcohol de 10-29,9 g/día (OR ajustada = 0,52; IC 95% = 0,30-0,89) (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de interacción entre consumo de alcohol y verduras y el riesgo de cáncer de pulmón

Alcohol (g/día)	<116,65 g/día Verduras		≥116,65 g/día Verduras	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
No bebedor (<0,1)	73/57	1,00	56/79	1,00
0,1-9,9	73/92	0,61 [0,61-1,05]	64/112	0,63 [0,36-1,11]
10-29,9	101/81	0,97 [0,57-1,64]	45/62	0,52 [0,30-0,89]
≥30	117/92	1,08 [0,65-1,81]	59/69	0,66 [0,37-1,19]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

4.3.3 Análisis de interacción alcohol-frutas

También existe una interacción entre un consumo de frutas ≥233,13 g/día y todas las categorías de consumo de alcohol, de forma que esta interacción resulta en una protección frente al desarrollo de cáncer de pulmón. Dicha interacción es casi estadísticamente significativa para la categoría de consumo de alcohol de 10-29,9 g/día (OR ajustada = 0,58; IC 95% = 0,33-1,03) y en el resto no es estadísticamente significativa (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de interacción entre consumo de alcohol y frutas y el riesgo de cáncer de pulmón

Alcohol (g/día)	<233,13 g/día Frutas		≥233,13 g/día Frutas	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
No bebedor (<0,1)	65/48	1,00	64/88	1,00
0,1-9,9	77/100	0,66 [0,66-1,16]	60/104	0,77 [0,44-1,34]
10-29,9	93/73	1,07 [0,61-1,88]	53/70	0,58 [0,33-1,03]
≥30	117/101	1,10 [0,65-1,87]	59/60	0,70 [0,39-1,27]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), calorías (Kcal)

4.4 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS Arg48His Y Arg370Cys EN EL GEN *ADH1B*

La distribución de los genotipos para el polimorfismo Arg48His del gen *ADH1B* en casos y controles se muestra en la Tabla 13. No observamos diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia del alelo His entre casos y controles, siendo 0,09 en ambos casos. Debido al escaso número de individuos con el genotipo His/His para el polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* (6 en casos y 6 en controles), decidimos analizar la influencia del alelo variante His. Al analizar la asociación entre los genotipos del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, encontramos que los individuos portadores del alelo variante His no presentan un mayor riesgo a desarrollar cáncer de pulmón que los individuos con genotipo homocigoto salvaje Arg/Arg (OR = 0,95; IC 95% = 0,73-1,24). Al ajustar por edad, género, paquetes año, alcohol, vegetales, frutas y calorías observamos cierta asociación de protección, aunque no es estadísticamente significativa (OR ajustada = 0,77 IC 95% = 0,53-1,12).

Tabla 13. Análisis del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>ADH1B</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
Arg/Arg	658 (82,8)	613 (82,1)	Referencia	Referencia
Arg/His	131 (16,5)	128 (17,1)	0,95 [0,73-1,25]	0,77 [0,52-1,13]
His/His	6 (0,75)	6 (0,80)	0,93 [0,30-2,91]	0,79 [0,18-3,38]
Arg/His+His/His	137 (17,23)	134 (17,94)	0,95 [0,73-1,24]	0,77 [0,53-1,12]
Frecuencia alelo His	0,09	0,09		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

En este trabajo también hemos analizado la posible modificación que puede ejercer el consumo de alcohol en las asociaciones de los polimorfismos estudiados y el riesgo de cáncer de pulmón.

Vemos que el consumo de alcohol modifica el efecto que ejerce el polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* sobre el riesgo de cáncer de pulmón, de modo que un consumo de alcohol entre 10-29,9 g/día en individuos portadores del alelo variante His, aumenta el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 3,32; IC 95% = 1,03-10,70). Por el contrario, un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día en individuos con genotipo homocigoto salvaje Arg/Arg disminuye el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,67; IC 95% = 0,41-1,08) (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de alcohol (g/día)	Casos/Controles OR ajustada ^a [IC 95%]	
	Arg/Arg	His-carriers
No bebedor (<0,1)	93/89 1,00	21/26 1,00
0,1-9,9	95/140 0,67 [0,41-1,08]	25/43 0,93 [0,34-2,54]
10-29,9	107/117 0,81 [0,50-1,31]	26/13 3,32 [1,03-10,70]
≥30	140/125 1,18 [0,73-1,89]	17/18 1,56 [0,51-4,75]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

En el caso del polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B*, la frecuencia del alelo variante Cys es muy similar en casos y controles (0,004 y 0,006 respectivamente). Debido a la baja frecuencia del genotipo variante Cys/Cys, en este caso también hemos analizado a los individuos portadores del alelo variante Cys, de forma que en esta categoría están incluidos los individuos con genotipos Arg/Cys y Cys/Cys. Al analizar la posible asociación entre el polimorfismo Arg370Cys y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, observamos cierta protección en los individuos portadores del alelo variante Cys, aunque dicha asociación no estadísticamente significativa (OR = 0,73; IC 95% = 0,27-1,98). Al ajustar por edad, género, paquetes año, alcohol, vegetales, frutas y calorías, observamos la misma relación de protección en individuos portadores del alelo variante Cys (OR ajustada = 0,60; IC 95% = 0,16-2,23), aunque dicha asociación tampoco es estadísticamente significativa (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis del polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>ADH1B</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
Arg/Arg	775 (99,1)	729 (98,8)	Referencia	Referencia
Arg/Cys	7 (0,9)	9 (1,2)	0,73 [0,27-1,98]	0,60 [0,16-2,23]
Cys/Cys	0 (0,0)	0 (0,0)	----- ^b	----- ^b
Cys carriers	7 (0,9)	9 (1,2)	0,73 [0,27-1,98]	0,60 [0,16-2,23]
Frecuencia alelo Cys	0,004	0,006		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

^b Las ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

En el caso del polimorfismo Arg370Cys no podemos comprobar si el consumo de alcohol modifica el efecto que ejerce dicho polimorfismo sobre el riesgo de cáncer de pulmón, ya que no disponemos de individuos suficientes para hacer los cálculos pertinentes en todas las categorías (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis del polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B* y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de alcohol (g/día)	Casos/Controles OR ajustada ^a [IC 95%]	
	Arg/Arg	Cys-carriers
No bebedor (<0,1)	114/112 1,00	0/1 1,00
0,1-9,9	115/177 0,67 [0,43-1,04]	2/3 ----- ^b
10-29,9	129/127 0,95 [0,61-1,48]	2/3 ----- ^b
≥30	155/141 1,24 [0,81-1,91]	0/2 ----- ^b

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

^b Las ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

4.4.1 Análisis estratificado del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B*

En todos los polimorfismos sometidos a estudio realizamos un análisis estratificado de los datos con el objeto de identificar los subgrupos en los que la asociación es más intensa. Al estratificar subdividimos la población heterogénea en subpoblaciones, denominados estratos, cada uno de los cuales es internamente homogéneo.

En nuestro estudio, atendiendo a la información recogida, llevamos a cabo 6 estratificaciones: por género, por edades (dividiendo a los participantes en el estudio en menores de 55 años, entre 55 y 69 años y mayores de 70 años), por hábito tabáquico

(distinguiendo entre no fumadores y fumadores, dividiendo éstos a su vez en ex-fumadores y fumadores actuales), por tipo histológico del caso (teniendo en cuenta las histologías más frecuentes entre los casos participantes en el estudio), por consumo de verduras y por consumo de frutas (Tabla 17).

En la estratificación por género observamos que individuos portadores del alelo variante His presentan cierta protección frente al desarrollo de cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres (OR ajustada = 0,79; IC 95% = 0,53-1,19; OR ajustada = 0,71; IC 95% = 0,23-2,25, respectivamente). Dicha asociación no es estadísticamente significativa.

Parece existir una relación entre la edad y el polimorfismo Arg48His, ya que los individuos portadores del alelo variante His presentan un aumento del riesgo casi estadísticamente significativo a desarrollar cáncer de pulmón en el grupo de individuos menores de 55 años (OR ajustada = 2,56; IC 95% = 1,00-6,52). Por el contrario, los individuos portadores del alelo variante His con una edad entre 55-69 años y en individuos ≥ 70 años, observamos una cierta protección a desarrollar cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,57; IC 95% = 0,31-1,06; OR ajustada = 0,68; IC 95% = 0,38-1,21, respectivamente).

En el caso del hábito tabáquico, exfumadores portadores del alelo variante His tienen un menor riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,25; IC 95% = 0,04-1,50), mientras que portadores de dicho alelo que son fumadores actuales tienen un aumento del riesgo de esta neoplasia (OR ajustada = 1,40; IC 95% = 0,78-2,52). Las asociaciones descritas no son estadísticamente significativas.

En cuanto a la estratificación por tipo histológico, individuos portadores del alelo variante His, presentan un menor riesgo de desarrollar todos los tipos histológicos estudiados (OR ajustada = 0,81; IC 95% = 0,49-1,35 para epidermoide; OR ajustada = 0,75; IC 95% = 0,44-1,28 para adenocarcinoma; OR ajustada = 0,81; IC 95% = 0,40-1,63 para microcítico). Observamos esta misma asociación de protección para todas las categorías de consumo de verduras en individuos portadores del alelo variante His (OR ajustada = 0,84; IC 95% = 0,40-1,75 para un consumo $< 67,12$ g/día; OR ajustada = 0,75; IC 95% = 0,36-1,58 para un consumo 67,12-114,95; OR ajustada = 0,76; IC 95% = 0,32-

1,77 para un consumo 114,95-196,51 g/día; OR ajustada = 0,71; IC 95% = 0,30-1,68 para un consumo >196,51 g/día).

En el caso de la estratificación por la ingesta diaria de frutas observamos un efecto protector en portadores del alelo variante His con un consumo de frutas entre 115,89-228,71 g/día (OR ajustada = 0,70; IC 95% = 0,29-1,71), así como para un consumo entre 228,71-375,4 g/día (OR ajustada = 0,54; IC 95% = 0,20-1,41).

Tabla 17. Análisis estratificado del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B*

Variables	Casos/Controles		OR ajustada ^a [IC 95%]		
	Arg/Arg	His-carriers	Arg/Arg	His-carriers	p tend ^b
Género					
Hombres	589/530	120/120	1,00	0,79 [0,53-1,19]	0,209
Mujeres	69/83	16/14	1,00	0,71 [0,23-2,25]	0,472
Edad (años)					
< 55	103/145	20/17	1,00	2,56 [1,00-6,52]	0,058
55 - 69	279/233	48/55	1,00	0,57 [0,31-1,06]	0,102
≥ 70	276/235	69/62	1,00	0,68 [0,38-1,21]	0,127
Hábito tabáquico					
No fumador	37/174	8/37	1,00	0,25 [0,04-1,50]	0,166
Fumador	621/439	129/97	1,00	1,04 [0,72-1,49]	0,935
Ex-fumador	272/256	62/60	1,00	0,96 [0,58-1,59]	0,724
Fumador actual ^c	337/180	64/34	1,00	1,40 [0,78-2,52]	0,284
Tipos histológicos ^d					
Epidermoide	267	57	1,00	0,81 [0,49-1,35]	0,304
Adenocarcinoma	201	42	1,00	0,75 [0,44-1,28]	0,248
Microcítico	111	24	1,00	0,81 [0,40-1,63]	0,764
Verduras (g/día)					
<67,12	152/117	32/24	1,00	0,84 [0,40-1,75]	0,489
67,12-114,95	116/120	22/23	1,00	0,75 [0,36-1,58]	0,427
114,95-196,51	86/117	17/26	1,00	0,76 [0,32-1,77]	0,844
>196,51	81/117	18/27	1,00	0,71 [0,30-1,68]	0,201
Frutas (g/día)					
<115,89	153/121	34/20	1,00	0,91 [0,44-1,87]	0,912
115,89-228,71	111/115	19/27	1,00	0,70 [0,29-1,71]	0,578
228,71-375,4	75/116	9/27	1,00	0,54 [0,20-1,41]	0,113
>375,24	96/119	27/26	1,00	1,05 [0,52-2,12]	0,729

^{a,b} Ajustadas por: edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

(cuando corresponda)

^c Incluye exfumadores desde hace menos de un año (≤1año)

^d Se consideran todos los controles

4.4.2 Análisis estratificado del polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B*

En el caso del polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B*, observamos que individuos portadores del alelo variante Cys tienen un mayor riesgo de cáncer de pulmón si son mujeres (OR ajustada = 2,93; IC 95% = 0,15-56,07) y vemos una asociación opuesta en hombres (OR ajustada = 0,47; IC 95% = 0,11-2,03), aunque los intervalos de confianza son muy amplios (Tabla 18).

Debido al escaso número de casos portadores del alelo variante Cys, no hemos podido evaluar la posible asociación en individuos <55 años. Individuos pertenecientes al rango de edad entre 55 y 69 años que son portadores del alelo Cys, tienen una cierta protección frente al desarrollo de esta neoplasia (OR ajustada = 0,29 IC 95% = 0,05-1,76). Observamos todo lo contrario en el caso de individuos ≥ 70 años portadores del alelo Cys (OR ajustada = 4,25; IC 95% = 0,33-54,02), aunque ninguna de las dos asociaciones es estadísticamente significativa.

Individuos no fumadores portadores del alelo variante Cys tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (OR ajustada = 8,70; IC 95% = 0,38-199,83), pero el intervalo de confianza es excesivamente amplio debido al bajo número de casos (2). Sin embargo, vemos un efecto protector en fumadores, tanto en exfumadores como en fumadores actuales (OR ajustada = 0,32; IC 95% = 0,04-2,83; OR ajustada = 0,49; IC 95% = 0,03-8,63; respectivamente), aunque no es estadísticamente significativo. Esta protección también es observada para todos los tipos histológicos estudiados en individuos portadores del alelo variante Cys (OR ajustada = 0,60; IC 95% = 0,11-3,15 para epidermoide; OR ajustada = 0,36; IC 95% = 0,04-3,04 para adenocarcinoma; OR ajustada = 0,81; IC 95% = 0,09-7,43 para microcítico).

Un bajo consumo diario de verduras (<67,12 g/día) aumenta el riesgo de esta enfermedad en portadores del alelo Cys (OR ajustada = 3,04; IC 95% = 0,43-21,66). No hemos podido analizar la posible asociación en el resto de categorías de consumo diario de verduras, debido a que no disponíamos de suficientes individuos para el análisis.

Por último, un consumo diario de frutas entre 228,71-375,4 g/día en individuos portadores del alelo variante Cys, parece ejercer un efecto beneficioso frente al cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,69; IC 95% = 0,04-11,04), aunque este efecto no es estadísticamente significativo.

Tabla 18. Análisis estratificado del polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B*

Variables	Casos/Controles		OR ajustada ^a [IC 95%]		
	Arg/Arg	Cys-carriers	Arg/Arg	Cys-carriers	P tend ^b
Género					
Hombres	692/635	6/8	1,00	0,47 [0,11-2,03]	0,293
Mujeres	83/94	1/1	1,00	2,93 [0,15-56,07]	0,469
Edad (años)					
< 55	120/159	0/2	1,00	----- ^e	0,989
55 - 69	316/279	4/6	1,00	0,29 [0,05-1,76]	0,165
≥ 70	339/291	3/1	1,00	4,25 [0,33-54,02]	0,208
Hábito tabáquico					
No fumador	43/205	2/2	1,00	8,70 [0,38-199,83]	0,160
Fumador	732/524	5/7	1,00	0,26 [0,05-1,28]	0,096
Ex-fumador	325/309	1/5	1,00	0,32 [0,04-2,83]	0,298
Fumador actual ^c	392/210	4/1	1,00	0,49 [0,03-8,63]	0,615
Tipos histológicos ^d					
Epidermoide	318	2	1,00	0,60 [0,11-3,15]	0,546
Adenocarcinoma	238	1	1,00	0,36 [0,04-3,04]	0,359
Microcítico	127	3	1,00	0,81 [0,09-7,43]	0,843
Verduras (g/día)					
<67,12	179/137	2/3	1,00	3,04 [0,43-21,66]	0,375
67,12-114,95	137/140	0/3	1,00	----- ^e	-----
114,95-196,51	102/139	0/3	1,00	----- ^e	-----
>196,51	95/141	2/0	1,00	----- ^e	-----
Frutas (g/día)					
<115,89	186/138	0/3	1,00	----- ^e	-----
115,89-228,71	128/138	1/2	1,00	1,53 [0,12-19,69]	0,671
228,71-375,4	82/139	1/2	1,00	0,69 [0,04-11,04]	0,723
>375,24	117/142	2/2	1,00	1,63 [0,21-12,70]	0,639

^{a,b} Ajustadas por: edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal) (cuando corresponda)

^c Incluye exfumadores desde hace menos de un año (≤ 1 año)

^d Se consideran todos los controles

^e Las ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

4.5 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Ile349Val EN EL GEN *ADH1C*

La distribución de los genotipos para el polimorfismo Ile349Val del gen *ADH1C* en casos y controles se muestra en la Tabla 19. No observamos diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia del alelo Val entre casos y controles, siendo ésta 0,34 en ambos casos. En cuanto al genotipo variante Val/Val, el porcentaje es ligeramente inferior en los casos que en los controles (55,56% vs. 56,50%). Al analizar la asociación entre los genotipos del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, encontramos que los individuos homocigotos para el alelo variante Val no presentan un mayor riesgo a desarrollar cáncer de pulmón que los individuos con genotipo homocigoto salvaje Ile/Ile (OR = 0,96; IC 95% = 0,69-1,32). Al ajustar por edad, género, paquetes año, alcohol, vegetales, frutas y calorías tampoco observamos asociación (OR ajustada = 1,08 (IC 95% = 0,69-1,70).

Tabla 19. Análisis del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>ADH1C</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
Ile/Ile	372 (44,4)	331 (43,5)	Referencia	Referencia
Ile/Val	368 (44,0)	340 (44,7)	0,96 [0,78-1,18]	1,10 [0,83-1,46]
Val/Val	97 (55,6)	90 (11,8)	0,96 [0,69-1,32]	1,08 [0,69-1,70]
Frecuencia alelo Val	0,34	0,34		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

Para el polimorfismo Ile349Val del gen *ADH1C* hemos visto que en individuos con genotipo homocigoto salvaje Ile/Ile, un consumo de alcohol ≥ 30 g/día aumenta el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 1,48; IC 95% = 0,79-2,78). Por el contrario, individuos con el mismo consumo de alcohol (≥ 30 g/día) pero con genotipo homocigoto variante Val/Val, se asocia con una disminución del riesgo de cáncer pulmón (OR ajustada = 0,58; IC 95% = 0,16-2,09) (Tabla 20).

Tabla 20. Análisis del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de alcohol (g/día)	Casos/Controles OR ajustada ^a [IC 95%]		
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val
No bebedor (<0,1)	55/59 1,00	52/46 1,00	15/11 1,00
0,1-9,9	60/77 1,07 [0,58-1,99]	57/92 0,55 [0,28-1,08]	13/16 0,42 [0,10-1,81]
10-29,9	68/67 1,17 [0,63-2,17]	57/49 0,97 [0,48-1,94]	16/17 0,46 [0,13-1,63]
≥ 30	74/55 1,48 [0,79-2,78]	79/73 1,30 [0,68-2,47]	16/19 0,58 [0,16-2,09]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

4.5.1 Análisis estratificado del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C*

Individuos heterocigotos Ile/Val para el polimorfismo Ile349Val del gen *ADH1C* parecen presentar, como podemos observar en la Tabla 21, un mayor riesgo de cáncer de pulmón en hombres (OR ajustada = 1,19; IC 95% = 0,87-1,63), mientras que mujeres con el mismo genotipo parecen presentar cierta protección frente al desarrollo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,60; IC 95% = 0,24-1,47). En el caso de individuos con genotipo homocigoto variante Val/Val, el riesgo de cáncer de pulmón es mayor tanto en hombres como en mujeres, aunque dicho aumento es más notorio en mujeres (OR

ajustada = 1,06; IC 95% = 0,65-1,74; OR ajustada = 1,40; IC 95% = 0,40-4,82, respectivamente).

Con respecto a la estratificación por edades nos encontramos que, la presencia del genotipo homocigoto variante Val/Val parece disminuir el riesgo de cáncer de pulmón en individuos menores de 55 años (OR ajustada = 0,88; IC 95% = 0,32-2,47). Sin embargo, individuos ≥ 70 años con genotipo Val/Val tienen un aumento del riesgo de esta neoplasia (OR ajustada = 1,31; IC 95% = 0,63-2,72).

Individuos no fumadores con genotipo heterocigoto Ile/Val parecen tener menor riesgo a desarrollar cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,70; IC 95% = 0,26-1,88), mientras que individuos no fumadores con genotipo homocigoto variante Val/Val tienen un riesgo aumentado de dicha neoplasia (OR ajustada = 1,92; IC 95% = 0,54-6,86), aunque tenemos que tener en cuenta que en este estrato tenemos únicamente 7 casos con genotipo homocigoto variante. En fumadores no parece existir ninguna asociación con el polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C*.

Al estratificar por tipo histológico observamos el genotipo heterocigoto Ile/Val aumenta el riesgo de carcinoma epidermoide y microcítico (OR ajustada = 1,31; IC 95% = 0,88-1,95; OR ajustada = 1,38; IC 95% = 0,80-2,37, respectivamente). Por el contrario no encontramos asociación entre el genotipo heterocigoto Ile/Val y el adenocarcinoma (OR ajustada = 0,97; IC 95% = 0,65-1,44).

En la estratificación por consumo de verduras, observamos que un consumo de verduras $>196,51$ g/día en individuos con genotipo homocigoto variante Val/Val disminuye el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,60; IC 95% = 0,20-1,80).

Por último un consumo de frutas diario $<115,89$ g/día en individuos con genotipo homocigoto variante Val/Val aumenta el riesgo de esta neoplasia (OR ajustada = 1,71; IC 95% = 0,73-4,03). Por el contrario un consumo diario de frutas entre 115,89-228,71 g/día en individuos con genotipo Val/Val, parece conferir un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,65; IC 95% = 0,19-2,18).

Cabe destacar que ninguna de las asociaciones descritas en este apartado son estadísticamente significativas.

Tabla 21. Análisis estratificado del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C*

Variables	Casos/Controles			OR ajustada ^a [IC 95%]			P tend ^b
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	
Género							
Hombres	333/293	331/293	86/77	1,00	1,19 [0,87-1,63]	1,06 [0,65-1,74]	0,445
Mujeres	40/38	37/47	11/13	1,00	0,60 [0,24-1,47]	1,40 [0,40-4,82]	0,909
Edad (años)							
< 55	50/58	65/87	17/19	1,00	0,66 [0,33-1,31]	0,88 [0,32-2,47]	0,600
55 - 69	164/141	138/118	37/34	1,00	1,18 [0,75-1,85]	0,92 [0,44-1,91]	0,875
≥ 70	159/132	165/135	43/37	1,00	1,24 [0,77-1,99]	1,31 [0,63-2,72]	0,378
Hábito tabáquico							
No fumador	25/94	18/99	7/22	1,00	0,70 [0,26-1,88]	1,92 [0,54-6,86]	0,681
Fumador	348/237	350/241	90/68	1,00	1,00 [0,75-1,33]	0,86 [0,55-1,34]	0,729
Ex-fumador	161/140	150/134	38/47	1,00	1,11 [0,74-1,67]	0,80 [0,44-1,47]	0,827
Fumador actual ^c	180/91	195/106	49/21	1,00	0,84 [0,55-1,30]	0,95 [0,45-2,03]	0,703
Tipos histológicos ^d							
Epidermoide	150	148	39	1,00	1,31 [0,88-1,95]	1,26 [0,68-2,32]	0,140
Adenocarcinoma	114	108	31	1,00	0,97 [0,65-1,44]	1,00 [0,54-1,86]	0,898
Microcítico	61	68	16	1,00	1,38 [0,80-2,37]	1,37 [0,60-3,13]	0,243
Verduras (g/día)							
<67,12	93/68	80/65	21/12	1,00	1,12 [0,64-1,96]	1,58 [0,65-3,83]	0,395
67,12-114,95	68/67	66/62	16/16	1,00	1,21 [0,70-2,09]	1,15 [0,47-2,83]	0,509
114,95-196,51	46/58	50/71	16/16	1,00	0,96 [0,51-1,81]	1,10 [0,42-2,87]	0,816
>196,51	50/65	49/62	7/19	1,00	1,08 [0,55-2,14]	0,60 [0,20-1,80]	0,426
Frutas (g/día)							
<115,89	88/67	88/65	22/13	1,00	1,24 [0,72-2,13]	1,71 [0,73-4,03]	0,256
115,89-228,71	68/57	61/76	9/12	1,00	0,74 [0,39-1,42]	0,65 [0,19-2,18]	0,421
228,71-375,4	41/65	41/64	11/16	1,00	1,07 [0,56-2,04]	0,93 [0,34-2,57]	0,899
>375,24	60/69	55/55	18/22	1,00	1,29 [0,72-2,31]	1,03 [0,46-2,35]	0,712

^{a,b} Ajustadas por: edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal) (cuando corresponda)

^c Incluye exfumadores desde hace menos de un año (≤ 1 año)

^d Se consideran todos los controles

4.6 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Glu504Lys EN EL GEN *ALDH2*

La distribución de los genotipos para el polimorfismo Glu504Lys en el gen *ALDH2* se muestra en la Tabla 22. En este caso todos los individuos son homocigotos salvajes Glu/Glu, por lo que no existe ninguna asociación entre el polimorfismo Glu504Lys en el gen *ADH1B* y el riesgo de cáncer de pulmón en nuestra población de estudio. Debido a que la población es 100% homocigota salvaje, no se han hecho más análisis para este polimorfismo.

Tabla 22. Análisis del polimorfismo Glu504Lys en el gen *ALDH2* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>ALDH2</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
Glu/Glu	794 (100,0)	747 (100,0)	Referencia	Referencia
Glu/Lys	0 (0,0)	0 (0,0)	----- ^b	----- ^b
Lys/Lys	0 (0,0)	0 (0,0)	----- ^b	----- ^b
Frecuencia alelo Lys	0,00	0,00		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

^b Las ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

4.7 ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS *TaqI*, *RsaI* Y *DraI* EN EL GEN *CYP2E1*

La distribución de los genotipos para el polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1* se muestra en la Tabla 23. La frecuencia del alelo Variante G es similar en casos y controles (0,11 y 0,12 respectivamente). En cuanto al genotipo variante G/G, el porcentaje es ligeramente inferior en los casos que en los controles (0,7% vs. 2,4%). Debido al escaso número de individuos con el genotipo G/G para el polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1* (4 en casos y 11 en controles), decidimos analizar la influencia del alelo variante G. Al analizar la asociación entre los genotipos del polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, encontramos que los individuos portadores del alelo variante G presentan un menor riesgo a desarrollar cáncer de pulmón que los individuos con genotipo homocigoto salvaje C/C (OR = 0,87; IC 95% = 0,65-1,18). Sin embargo, al ajustar por edad, género, paquetes año, alcohol, vegetales, frutas y calorías no observamos ninguna asociación con el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,95; IC 95% = 0,64-1,40).

Tabla 23. Análisis del polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>CYP2E1</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
C/C	435 (79,7)	360 (77,4)	Referencia	Referencia
C/G	107 (19,6)	94 (20,2)	0,94 [0,69-1,28]	1,04 [0,70-1,56]
G/G	4 (0,7)	11 (2,4)	0,30 [0,10-0,96]	0,30 [0,08-1,15]
G/C+G/G	111 (20,33)	105 (22,58)	0,87 [0,65-1,18]	0,95 [0,64-1,40]
Frecuencia alelo G	0,11	0,12		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

En el caso del polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1*, el consumo de alcohol no parece modificar el efecto que este polimorfismo ejerce sobre el riesgo cáncer de pulmón (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis del polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1* y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de alcohol (g/día)	Casos/Controles OR ajustada ^a [IC 95%]	
	C/C	G-carriers
No bebedor (<0,1)	60/55 1,00	18/16 1,00
0,1-9,9	72/89 0,81 [0,45-1,48]	23/35 0,71 [0,24-2,15]
10-29,9	75/76 0,95 [0,53-1,72]	18/18 0,95 [0,29-3,15]
≥30	88/76 1,34 [0,74-2,42]	22/21 0,96 [0,29-3,16]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

En el caso del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1*, la frecuencia del alelo variante *c2* es igual para casos y controles, siendo esta frecuencia de 0,04. Debido a la baja frecuencia del genotipo variante *c2/c2*, en este caso también hemos analizado a los individuos portadores del alelo variante *c2*, de forma que en esta categoría están incluidos los individuos con genotipos *c1/c2* y *c2/c2*. No encontramos ninguna asociación al analizar los diferentes genotipos del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón (Tabla 25).

Tabla 25. Análisis del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>CYP2E1</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
<i>c1/c1</i>	499 (92,8)	471 (92,2)	Referencia	Referencia
<i>c1/c2</i>	37 (6,9)	38 (7,4)	0,92 [0,57-1,47]	0,76 [0,41-1,42]
<i>c2/c2</i>	2 (0,4)	2 (0,4)	0,94 [0,13-6,74]	6,56 [0,49-87,03]
<i>c1/c2+c2/c2</i>	39 (7,25)	40 (7,83)	0,92 [0,58-1,46]	0,86 [0,47-1,57]
Frecuencia alelo <i>c2</i>	0,04	0,04		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

Por otro lado, en la Tabla 26 podemos observar que el consumo de alcohol influye en la asociación entre el polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón de modo que, tanto un consumo bajo-moderado de alcohol (0,1-9,9 g/día), moderado-alto (10-29,9 g/día), como elevado (≥30 g/día), aumenta el riesgo de cáncer de pulmón en individuos portadores del alelo variante *c2* (OR ajustada = 2,02; IC 95% = 0,24-17,35; OR ajustada = 1,58; IC 95% = 0,18-13,58; IC ajustada = 2,10; IC 95% = 0,21-20,77, respectivamente).

Tabla 26. Análisis del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1* y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de alcohol (g/día)	Casos/Controles OR ajustada ^a [IC 95%]	
	c1/c1	c2-carriers
No bebedor (<0,1)	81/67 1,00	5/6 1,00
0,1-9,9	80/111 0,52 [0,30-0,91]	11/15 2,02 [0,24-17,35]
10-29,9	82/86 0,73 [0,41-1,27]	8/9 1,58 [0,18-13,58]
≥30	116/106 1,07 [0,62-1,83]	6/5 2,10 [0,21-20,77]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Para el polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1*, la frecuencia del alelo variante C es la misma en casos y controles, 0,10. Debido al escaso número de individuos con el genotipo C/C para el polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1* (12 en casos y 7 en controles), es este caso también decidimos analizar la influencia del alelo variante C. En este caso tampoco se encuentra ninguna asociación entre los diferentes genotipos del polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1* y el riesgo de cáncer de pulmón (Tabla 27).

Tabla 27. Análisis del polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>CYP2E1</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
D/D	682 (81,7)	620 (81,8)	Referencia	Referencia
D/C	141 (16,9)	131 (17,3)	0,98 [0,75-1,27]	0,96 [0,67-1,37]
C/C	12 (1,4)	7 (0,9)	1,56 [0,61-3,99]	1,91 [0,58-6,35]
D/C+C/C	153 (18,32)	138 (18,21)	1,01 [0,78-1,30]	1,01 [0,71-1,42]
Frecuencia alelo C	0,10	0,10		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

Cuando analizamos el efecto que el consumo de alcohol puede ejercer en el polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1* en relación al riesgo de cáncer de pulmón, observamos que un consumo de alcohol ≥30 g/día aumenta el riesgo de cáncer de pulmón en individuos portadores del alelo variante C (OR ajustada = 1,92; IC 95% = 0,69-5,36; OR ajustada = 1,64; IC 95% = 0,63-4,26). Observamos el mismo efecto con un consumo de alcohol de 10-29,9 g/día en individuos portadores del alelo variante C (OR ajustada = 1,83; IC 95% = 0,67-4,99) (Tabla 28). Dichas asociaciones no son estadísticamente significativas.

Tabla 28. Análisis del polimorfismo *Dral* en el gen *CYP2E1* y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de alcohol (g/día)	Casos/Controles OR ajustada ^a [IC 95%]	
	D/D	C-carriers
No bebedor (<0,1)	101/93 1,00	20/23 1,00
0,1-9,9	108/149 0,67 [0,42-1,08]	21/36 0,73 [0,26-2,07]
10-29,9	109/110 0,84 [0,52-1,36]	32/22 1,83 [0,67-4,99]
≥30	138/120 1,10 [0,69-1,76]	31/27 1,64 [0,63-4,26]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

4.7.1 Análisis estratificado del polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1*

Como podemos observar en la Tabla 29, no encontramos asociación entre el género y el polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1*. En cuanto a la estratificación por edad, observamos que individuos portadores del alelo variante G menores de 55 años tienen un ligero aumento del riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 1,29; IC 95% = 0,55-3,03).

En lo referente al hábito tabáquico, portadores del alelo variante G, tanto no fumadores como exfumadores, tienen un riesgo menor de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,66; IC 95% = 0,17-2,49; OR ajustada = 0,74; IC 95% = 0,41-1,32, respectivamente). Sin embargo, fumadores actuales portadores del alelo variante G tienen un riesgo aumentado de esta neoplasia (OR ajustada = 1,37; IC 95% = 0,74-2,53). No parece existir asociación entre este polimorfismo y los diferentes tipos histológicos.

Por último, un consumo elevado tanto de verduras como de frutas en individuos portadores del alelo variante G, confiere cierta protección frente al desarrollo de esta neoplasia (OR ajustada = 0,78; IC 95% = 0,31-1,97; OR ajustada = 0,87; IC 95% = 0,35-2,17, respectivamente).

Cabe destacar que ninguna de las asociaciones descritas son significativamente estadísticas.

Tabla 29. Análisis estratificado del polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1*

Variables	Casos/Controles		OR ajustada ^a [IC 95%]		P tend ^b
	C/C	G-carriers	C/C	G-carriers	
Género					
Hombres	395/319	100/89	1,00	0,98 [0,64-1,50]	0,599
Mujeres	40/41	11/16	1,00	0,88 [0,27-2,88]	0,712
Edad (años)					
< 55	63/83	23/22	1,00	1,29 [0,55-3,03]	0,621
55 - 69	185/138	39/39	1,00	0,94 [0,49-1,78]	0,613
≥ 70	187/139	49/44	1,00	0,81 [0,42-1,57]	0,377
Hábito tabáquico					
No fumador	21/97	6/35	1,00	0,66 [0,17-2,49]	0,416
Fumador	414/263	105/70	1,00	1,04 [0,70-1,55]	0,926
Ex-fumador	196/155	41/44	1,00	0,74 [0,41-1,32]	0,394
Fumador actual ^c	207/105	60/25	1,00	1,37 [0,74-2,53]	0,635
Tipos histológicos ^d					
Epidermoide	177	40	1,00	1,01 [0,59-1,76]	0,747
Adenocarcinoma	132	38	1,00	1,04 [0,62-1,74]	0,829
Microcítico	70	16	1,00	0,97 [0,46-2,06]	0,916
Verduras (g/día)					
<67,12	102/76	29/25	1,00	1,16 [0,56-2,36]	1,000
67,12-114,95	74/76	24/17	1,00	1,38 [0,60-3,19]	0,378
114,95-196,51	58/71	16/25	1,00	0,68 [0,28-1,66]	0,318
>196,51	61/73	12/23	1,00	0,78 [0,31-1,97]	0,425
Frutas (g/día)					
<115,89	111/78	27/25	1,00	0,85 [0,43-1,70]	0,634
115,89-228,71	69/71	23/24	1,00	1,08 [0,46-2,52]	0,803
228,71-375,4	46/74	16/20	1,00	1,40 [0,56-3,49]	0,596
>375,24	69/73	15/21	1,00	0,87 [0,35-2,17]	0,609

^{a,b} Ajustadas por: edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal) (cuando corresponda)

^c Incluye exfumadores desde hace menos de un año (≤ 1 año)

^d Se consideran todos los controles

4.7.2 Análisis estratificado del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1*

En el análisis estratificado del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1*, observamos que mujeres portadoras del alelo variante c2 tienen un menor riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,22; IC 95% = 0,02-2,68), aunque no es estadísticamente significativo (Tabla 30).

Parece existir una relación entre la edad y el polimorfismo *RsaI*, ya que individuos portadores del alelo variante c2 presentan una disminución casi estadísticamente significativa del riesgo a desarrollar esta neoplasia en el grupo de individuos menores de 50 años (OR ajustada = 0,17; IC 95% = 0,03-0,94).

Respecto al hábito tabáquico, observamos un efecto protector en individuos portadores del alelo variante c2 que son fumadores actuales (OR ajustada = 0,50; IC 95% = 0,19-1,35). Sin embargo, individuos no fumadores portadores del alelo variante c2

tienen un mayor riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 4,37; IC 95% = 0,40-47,57), aunque los intervalos de confianza son muy amplios.

Cuando estratificamos por tipo histológico, vemos que ser portador del alelo variante c2 confiere cierta protección frente al carcinoma microcítico y epidermoide (OR ajustada = 0,29; IC 95% = 0,07-1,25; OR ajustada = 0,40; IC 95% = 0,16-1,05, respectivamente). En el caso del epidermoide, la asociación es casi estadísticamente significativa.

En el caso de las estratificaciones por consumo diario de verduras y frutas, observamos que en las categorías de menor consumo, tanto de verduras como de frutas, hay un efecto protector en individuos portadores del alelo variante c2 (OR ajustada = 0,37; IC 95% = 0,09-1,58; OR ajustada = 0,12; IC 95% = 0,03-0,54, respectivamente), siendo esta asociación estadísticamente significativa en el caso del consumo de frutas.

Tabla 30. Análisis estratificado del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1*

Variables	Casos/Controles		OR ajustada ^a [IC 95%]		
	c1/c1	c2-carriers	c1/c1	c2-carriers	p tend ^b
Género					
Hombres	448/411	37/36	1,00	0,84 [0,44-1,63]	0,822
Mujeres	51/60	2/4	1,00	0,22 [0,02-2,68]	0,277
Edad (años)					
< 55	79/104	3/14	1,00	0,17 [0,03-0,94]	0,039
55 - 69	196/176	17/14	1,00	0,86 [0,31-2,40]	0,705
≥ 70	224/191	19/12	1,00	1,18 [0,40-3,48]	0,206
Hábito tabáquico					
No fumador	29/132	2/8	1,00	4,37 [0,40-47,57]	0,115
Fumador	470/339	37/32	1,00	0,85 [0,47-1,54]	0,946
Ex-fumador	214/207	22/20	1,00	1,25 [0,57-2,71]	0,311
Fumador actual ^c	244/127	14/12	1,00	0,50 [0,19-1,35]	0,298
Tipos histológicos ^d					
Epidermoide	193	16	1,00	0,40 [0,16-1,05]	0,182
Adenocarcinoma	166	14	1,00	1,08 [0,50-2,35]	0,472
Microcítico	78	6	1,00	0,29 [0,07-1,25]	0,283
Verduras (g/día)					
<67,12	127/91	9/5	1,00	0,37 [0,09-1,58]	0,313
67,12-114,95	94/90	6/13	1,00	0,42 [0,13-1,43]	0,166
114,95-196,51	75/100	7/11	1,00	0,89 [0,26-3,09]	0,975
>196,51	63/89	8/6	1,00	1,80 [0,40-8,00]	0,094
Frutas (g/día)					
<115,89	144/92	5/11	1,00	0,12 [0,03-0,54]	0,004
115,89-228,71	85/96	6/9	1,00	1,03 [0,24-4,40]	0,767
228,71-375,4	49/93	11/9	1,00	1,41 [0,40-5,00]	0,206
>375,24	81/89	8/6	1,00	1,26 [0,35-4,47]	0,409

^{a,b} Ajustadas por: edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal) (cuando corresponda)

^c Incluye exfumadores desde hace menos de un año (≤1año)

^d Se consideran todos los controles

4.7.3 Análisis estratificado del polimorfismo *Dral* en el gen *CYP2E1*

En el caso del análisis estratificado del polimorfismo *Dral* en el gen *CYP2E1* hay una relación protectora entre las mujeres y el citado polimorfismo, ya que mujeres portadoras del alelo variante C tienen un menor riesgo, estadísticamente significativo, de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0.18; IC 95% = 0.05-0.71) (Tabla 31).

Individuos ≥ 70 años portadores del alelo variante C, tienen un ligero aumento de esta neoplasia (OR ajustada = 1,30; IC 95% = 0.75-2,27), aunque el intervalo de confianza es amplio.

También existe un pequeño aumento del riesgo en individuos no fumadores y en fumadores actuales portadores del alelo variante C (OR ajustada = 1,22; IC 95% = 0.38-3,93; OR ajustada = 1,13; IC 95% = 0,66-1,93, respectivamente), aunque en ambos casos no es estadísticamente significativo.

En cuanto al tipo histológico, individuos portadores del alelo variante C tienen un menor riesgo de desarrollar el carcinoma microcítico (OR ajustada = 0,69; IC 95% = 0,34-1,38).

No encontramos asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer de pulmón cuando estratificamos por la ingesta diaria de verduras.

Por último, un consumo de frutas $< 115,89$ y de $115,89-228,71$ en individuos portadores del alelo variante C, confiere cierta protección frente al desarrollo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,84; IC 95% = 0,42-1,68; OR ajustada = 0,68; IC 95% = 0,31-1,49, respectivamente). Sin embargo, un consumo diario de frutas de $228,71-375,4$ g y $> 375,24$ g en individuos portadores del alelo variante C, está asociado con un aumento del riesgo de esta neoplasia (OR ajustada = 1,30; IC 95% = 0,65-2,60; OR ajustada = 1,38; IC 95% = 0,67-2,84, respectivamente). No obstante, dichas asociaciones no son estadísticamente significativas.

Tabla 31. Análisis estratificado del polimorfismo *Dral* en el gen *CYP2E1*

Variables	Casos/Controles		OR ajustada ^a [IC 95%]		
	D/D	C-carriers	D/D	C-carriers	p tend ^b
Género					
Hombres	602/542	146/118	1,00	1,20 [0,83-1,73]	0,254
Mujeres	80/78	7/20	1,00	0,18 [0,05-0,71]	0,073
Edad (años)					
< 55	114/126	17/37	1,00	0,75 [0,33-1,72]	0,327
55 - 69	277/241	60/51	1,00	0,86 [0,49-1,51]	0,536
≥ 70	291/253	76/50	1,00	1,30 [0,75-2,27]	0,136
Hábito tabáquico					
No fumador	42/183	8/30	1,00	1,22 [0,38-3,93]	0,363
Fumador	640/437	145/108	1,00	1,00 [0,71-1,40]	0,880
Ex-fumador	284/253	65/68	1,00	0,90 [0,56-1,46]	0,753
Fumador actual ^c	343/177	78/40	1,00	1,13 [0,66-1,93]	0,612
Tipos histológicos ^d					
Epidermoide	270	66	1,00	0,89 [0,55-1,43]	0,490
Adenocarcinoma	203	49	1,00	1,22 [0,77-1,94]	0,223
Microcítico	122	23	1,00	0,69 [0,34-1,38]	0,291
Verduras (g/día)					
<67,12	152/116	40/29	1,00	1,00 [0,52-1,91]	0,837
67,12-114,95	123/121	27/24	1,00	1,01 [0,50-2,03]	0,983
114,95-196,51	93/120	19/25	1,00	1,12 [0,52-2,44]	0,964
>196,51	88/115	18/30	1,00	0,95 [0,43-2,10]	0,887
Frutas (g/día)					
<115,89	167/121	30/24	1,00	0,84 [0,42-1,68]	0,314
115,89-228,71	115/113	23/32	1,00	0,68 [0,31-1,49]	0,733
228,71-375,4	65/113	27/31	1,00	1,30 [0,65-2,60]	0,169
>375,24	109/125	24/21	1,00	1,38 [0,67-2,84]	0,462

^{a,b} Ajustadas por: edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal) (cuando corresponda)

^c Incluye exfumadores desde hace menos de un año (≤ 1 año)

^d Se consideran todos los controles

4.8 ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO C677T EN EL GEN *MTHFR*

La distribución de los genotipos para el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* en casos y controles se muestra en la Tabla 32. No observamos diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia del alelo Val entre casos y controles, siendo ésta 0,36 para casos y 0,35 para los controles. Al analizar la asociación entre los genotipos del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón, encontramos que tanto los individuos homocigotos variantes T/T como individuos heterocigotos C/T, presentan un mayor riesgo a desarrollar cáncer de pulmón que los individuos con genotipo homocigoto salvaje C/C, aunque dicha asociación no es estadísticamente significativa (OR = 1,23; IC 95% = 0,80-1,89; OR = 1,23; IC 95% = 0,91-1,66, respectivamente).

Tabla 32. Análisis del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el riesgo de cáncer de pulmón

Genotipo <i>MTHFR</i>	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]
C/C	321 (40,8)	316 (42,6)	Referencia	Referencia
C/T	361 (45,9)	328 (44,2)	1,08 [0,87-1,34]	1,23 [0,91-1,66]
T/T	104 (13,2)	98 (13,2)	1,04 [0,76-1,43]	1,23 [0,80-1,89]
Frecuencia alelo T	0,36	0,35		

^a Ajustada por edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), vegetales (4 cat.), frutas (4 cat.) y calorías (kcal)

Cuando analizamos si el consumo de alcohol modifica el efecto del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* sobre el riesgo de cáncer de pulmón, observamos que, tanto con un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día como de 10-29,9 g/día en individuos con genotipo homocigoto variante T/T, el riesgo de cáncer de pulmón disminuye (OR ajustada = 0,39; IC 95% = 0,11-1,40; OR ajustada = 0,21; IC 95% = 0,06-0,77, respectivamente). Sin embargo, un consumo de alcohol ≥ 30 g/día en individuos con genotipo homocigoto variante T/T, aumenta el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 1,77; IC 95% = 0,43-7,35) (Tabla 33).

Tabla 33. Análisis del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de alcohol (g/día)	Casos/Controles OR ajustada ^a [IC 95%]		
	C/C	C/T	T/T
No bebedor (<0,1)	39/55 1,00	53/47 1,00	22/11 1,00
0,1-9,9	47/74 0,79 [0,39-1,61]	52/84 0,59 [0,31-1,13]	20/24 0,39 [0,11-1,40]
10-29,9	52/50 1,20 [0,58-2,46]	64/53 1,09 [0,57-2,08]	16/27 0,21 [0,06-0,77]
≥ 30	77/66 1,63 [0,84-3,15]	60/64 0,88 [0,46-1,70]	18/12 1,77 [0,43-7,35]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

4.8.1 Análisis de folato y cáncer de pulmón

En el caso del folato, no existe una asociación clara entre el consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón (Tabla 34).

Tabla 34. Análisis del consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón

Folato ($\mu\text{g}/\text{día}$)	Casos/Controles	OR cruda	OR ajustada ^a [IC 95%]
<223,83	173/161	1,00	1,00
223,83-265,39	141/161	0,82 [0,61-1,05]	1,13 [0,78-1,62]
265,39-320,96	143/161	0,83 [0,57-1,64]	1,26 [0,85-1,86]
>320,96	131/161	0,76 [0,65-1,81]	1,21 [0,77-1,91]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), alcohol (g/día), calorías (Kcal)

4.8.2 Análisis de folato, el polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y cáncer de pulmón

También hemos analizado si el consumo de folato modifica la posible asociación entre el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* y el riesgo de cáncer de pulmón. Hay una relación de protección entre los individuos con genotipo homocigoto variante T/T y las categorías de consumo de folato de 225,08-265,60 $\mu\text{g}/\text{día}$, 265,60-320,28 $\mu\text{g}/\text{día}$ y >328,28 $\mu\text{g}/\text{día}$ (OR ajustada = 0,33; IC 95% = 0,09-1,35; OR ajustada = 0,51; IC 95% = 0,15-1,72; OR ajustada = 0,46; IC 95% = 0,11-1,89; respectivamente), aunque en ningún caso son estadísticamente significativas (Tabla 35).

Tabla 35. Análisis del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón

Consumo de folato ($\mu\text{g}/\text{día}$)	C/C		C/T		T/T	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
<225,08	69/64	1,00	64/60	1,00	23/16	1,00
225,08-265,60	59/66	1,19 [0,64-2,19]	54/57	1,22 [0,65-2,26]	14/18	0,33 [0,09-1,35]
265,60-320,28	57/61	1,83 [0,94-3,55]	54/55	1,33 [0,68-2,60]	19/25	0,51 [0,15-1,72]
>328,28	39/54	1,63 [0,71-3,70]	57/76	1,14 [0,55-2,37]	20/15	0,46 [0,11-1,89]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

4.8.3 Análisis de alcohol, folato, el polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y cáncer de pulmón

También hemos analizado la posible asociación entre el consumo de folato y los diferentes genotipos asociados al polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* en función del consumo de alcohol.

No bebedores (<0,1 g/día):

En el caso de individuos no bebedores tanto con genotipo homocigoto salvaje C/C como con genotipo heterocigoto C/T, el riesgo de cáncer de pulmón disminuye con un consumo de folato >328,28 µg/día, aunque dicha asociación no es estadísticamente significativa (OR ajustada = 0,59; IC 95% = 0,06-5,54; OR ajustada = 0,86; IC 95% = 0,15-4,77, respectivamente). No se dispone de individuos suficientes con genotipo variante T/T para poder hacer los cálculos pertinentes (Tabla 36).

Tabla 36. Análisis del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón en individuos no bebedores (<0,1 g/día)

Consumo de folato (µg/día)	C/C		C/T		T/T	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
<225,08	12/10	1,00	10/7	1,00	6/1	1,00
225,08-265,60	8/15	0,50 [0,08-3,23]	14/7	1,85 [0,28-12,39]	2/2	----- ^b
265,60-320,28	11/12	1,39 [0,20-9,93]	14/10	1,16 [0,20-6,71]	5/3	----- ^b
>328,28	8/18	0,59 [0,06-5,54]	15/23	0,86 [0,15-4,77]	9/5	----- ^b

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

^bLas ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

Consumo de alcohol bajo-moderado (0,1-9,9 g/día):

Individuos con un consumo de alcohol entre 0,1-9,9 g/día con genotipo homocigoto variante T/T y con un consumo de folato >328,28 µg/día, parecen tener cierto efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,61; IC 95% = 0,01-36,75), por el contrario individuos con el mismo consumo de alcohol y folato pero con genotipo homocigoto salvaje C/C tienen un incremento en el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 2,03; IC 95% = 0,37-11,11). No obstante, no son asociaciones estadísticamente significativas (Tabla 37).

Tabla 37. Análisis del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón en individuos con un consumo de alcohol entre 0,1-9,9 g/día

Consumo de folato (µg/día)	C/C		C/T		T/T	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
<225,08	12/18	1,00	9/10	1,00	5/5	1,00
225,08-265,60	6/12	0,79 [0,17-3,77]	11/21	0,55 [0,12-2,57]	3/8	0,57 [0,01-43,38]
265,60-320,28	15/19	3,10 [0,71-13,61]	10/24	0,75 [0,14-3,97]	7/5	3,77 [0,13-106,83]
>328,28	14/25	2,03 [0,37-11,11]	22/29	1,20 [0,18-7,97]	5/6	0,61 [0,01-36,75]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Consumo de alcohol moderado-alto (10-29,9 g/día):

Con un consumo de alcohol entre 10-29,9 g/día, observamos que individuos pertenecientes a la categoría de mayor consumo de folato (>328,28 µg/día), tanto con genotipo heterocigoto C/T como con genotipo homocigoto variante T/T, parecen tener un menor riesgo de cáncer de pulmón, aunque no es estadísticamente significativo (OR ajustada = 0,46; IC 95% = 0,09-2,31; OR ajustada = 0,41; IC 95% = 0,01-18,27, respectivamente). Por el contrario, individuos con este mismo consumo de alcohol y folato pero con genotipo homocigoto salvaje C/C tienen un incremento en el riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 18,93; IC 95% = 1,36-263,62) (Tabla 38).

Tabla 38. Análisis del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón en individuos con un consumo de alcohol entre 10-29,9 g/día

Consumo de folato (µg/día)	C/C		C/T		T/T	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
<225,08	16/13	1,00	17/13	1,00	5/6	1,00
225,08-265,60	16/16	1,21 [0,29-4,96]	18/15	1,52 [0,43-5,35]	3/8	0,83 [0,07-9,32]
265,60-320,28	12/15	2,08 [0,42-10,28]	19/10	3,01 [0,70-12,85]	6/9	2,45 [0,14-41,78]
>328,28	8/6	18,93 [1,36-263,62]	10/15	0,46 [0,09-2,31]	2/4	0,41 [0,01-18,27]

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Consumo elevado de alcohol (≥30 g/día):

Por último, en el caso de un consumo de alcohol ≥30 g/día, individuos con genotipo homocigoto salvaje C/C y con genotipo heterocigoto C/T con un consumo de folato

>328,28 µg/día, tienen un mayor riesgo de cáncer de pulmón, aunque los intervalos son muy amplios (OR ajustada = 1,87; IC 95% = 0,30-11,54; OR ajustada = 1,98; IC 95% = 0,43-9,15, respectivamente). En este caso, no se dispone de individuos suficientes con genotipo homocigoto variante T/T para poder realizar los cálculos correspondientes (Tabla 39).

Tabla 39. Análisis del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y el consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón en individuos con un consumo de alcohol ≥30 g/día

Consumo de folato (µg/día)	C/C		C/T		T/T	
	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]	Casos/Controles	OR ajustada ^a [IC 95%]
<225,08	29/23	1,00	28/30	1,00	7/4	1,00
225,08-265,60	20/23	1,07 [0,34-3,39]	11/14	1,52 [0,46-5,06]	6/0	----- ^b
265,60-320,28	19/15	1,69 [0,49-5,84]	11/11	0,94 [0,23-3,85]	1/8	----- ^b
>328,28	9/5	1,87 [0,30-11,54]	10/9	1,98 [0,43-9,15]	4/0	----- ^b

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

^bLas ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

4.8.4 Análisis estratificado del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*

En el caso del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, mujeres con genotipo heterocigoto C/T, así como con genotipo homocigoto variante T/T, tienen un mayor riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 1,86; IC 95% = 0,75-4,66; OR ajustada = 2,46; IC 95% = 0,71-8,48, respectivamente), aunque los intervalos de confianza son muy amplios (Tabla 40).

Parece existir una relación estadísticamente significativa entre la edad y el polimorfismo C677T, ya que tanto individuos heterocigotos C/T como individuos con genotipo homocigoto variante T/T presentan un aumento del riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en el grupo de edad ≥70 años (OR ajustada = 1,53; IC 95% = 0,92-2,55; OR ajustada = 2,48; IC 95% = 1,23-5,01, respectivamente). Esta misma relación la observamos en individuos no fumadores heterocigotos C/T y homocigotos variantes T/T (OR ajustada = 2,31; IC 95% = 0,73-7,27; OR ajustada = 3,00; IC 95% = 0,68-13,24, respectivamente), aunque en este caso no es estadísticamente significativo.

Cuando estratificamos por tipo histológico observamos que individuos heterocigotos C/T tienen un aumento del riesgo casi estadísticamente significativo de carcinoma

epidermoide (OR ajustada = 1,41; IC 95% = 0,94-2,11). Individuos heterocigotos T/T tienen un mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma (OR ajustada = 1,59; IC 95% = 0,90-2,81).

Un consumo elevado tanto de verduras como de frutas confiere un mayor riesgo tanto en individuos heterocigotos C/T (OR ajustada = 1,63; IC 95% = 0,79-3,38; OR ajustada = 1,41; IC 95% = 0,76-2,62, respectivamente), como en individuos con genotipo homocigoto variante T/T (OR ajustada = 1,35; IC 95% = 0,49-3,75; OR ajustada = 1,59; IC 95% = 0,68-3,73, respectivamente). Sin embargo, individuos con genotipo homocigoto variante T/T con un consumo diario de frutas de 228,71-375,4, presentan un menor riesgo de cáncer de pulmón (OR ajustada = 0,54; IC 95% = 0,16-1,76). Sin embargo, ninguna de estas asociaciones es estadísticamente significativa.

Tabla 40. Análisis estratificado del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*

Variables	Casos/Controles			OR ajustada ^a [IC 95%]			P tend ^b
	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	
Género							
Hombres	298/272	311/288	92/87	1,00	1,16 [0,83-1,61]	1,12 [0,70-1,79]	0,546
Mujeres	23/44	50/40	12/11	1,00	1,86 [0,75-4,66]	2,46 [0,71-8,48]	0,088
Edad (años)							
< 55	50/59	59/77	12/25	1,00	0,86 [0,42-1,76]	0,83 [0,28-2,43]	0,662
55 - 69	137/126	146/120	40/41	1,00	1,28 [0,79-2,05]	0,74 [0,37-1,49]	0,970
≥ 70	134/131	156/131	52/32	1,00	1,53 [0,92-2,55]	2,48 [1,23-5,01]	0,014
Hábito tabáquico							
No fumador	13/83	25/94	7/32	1,00	2,31 [0,73-7,27]	3,00 [0,68-13,24]	0,049
Fumador	308/233	336/234	97/66	1,00	1,15 [0,85-1,55]	1,16 [0,76-1,79]	0,418
Ex-fumador	137/132	144/144	47/38	1,00	1,06 [0,69-1,62]	1,19 [0,65-2,17]	0,852
Fumador actual ^c	165/97	186/89	47/27	1,00	1,27 [0,81-2,00]	1,06 [0,54-2,07]	0,506
Tipos histológicos ^d							
Epidermoide	132	150	38	1,00	1,41 [0,94-2,11]	1,03 [0,55-1,92]	0,371
Adenocarcinoma	92	112	36	1,00	1,28 [0,84-1,95]	1,59 [0,90-2,81]	0,069
Microcítico	60	57	16	1,00	0,75 [0,42-1,33]	0,98 [0,45-2,15]	0,586
Verduras (g/día)							
<67,12	82/69	78/54	22/17	1,00	1,17 [0,65-2,11]	0,89 [0,36-2,18]	0,978
67,12-114,95	57/64	61/57	20/22	1,00	1,57 [0,87-2,82]	1,23 [0,55-2,78]	0,298
114,95-196,51	41/59	44/63	17/19	1,00	0,95 [0,47-1,90]	1,47 [0,57-3,77]	0,537
>196,51	35/53	46/74	17/16	1,00	1,63 [0,79-3,38]	1,35 [0,49-3,75]	0,511
Frutas (g/día)							
<115,89	81/59	80/63	25/19	1,00	1,31 [0,74-2,30]	1,45 [0,64-3,29]	0,317
115,89-228,71	58/63	49/55	22/22	1,00	0,82 [0,40-1,66]	0,96 [0,38-2,44]	0,827
228,71-375,4	32/61	45/65	7/15	1,00	1,38 [0,69-2,75]	0,54 [0,16-1,76]	0,856
>375,24	44/62	55/65	22/18	1,00	1,41 [0,76-2,62]	1,59 [0,68-3,73]	0,302

^{a,b} Ajustadas por: edad, género, paquetes año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal) (cuando corresponda)

^c Incluye exfumadores desde hace menos de un año (≤ 1 año)

^d Se consideran todos los controles

4.9 ANÁLISIS DE LIGAMIENTO

Los genes que codifican las ADHs analizadas en este trabajo están localizados en zonas muy próximas del mismo cromosoma. Así, el gen *ADH1B* y el gen *ADH1C* se localizan en una pequeña región del cromosoma 4q22. Por otro lado los tres polimorfismos estudiados en el gen *CYP2E1* (*TaqI*, *RsaI* y *DraI*) se encuentran en el mismo gen localizado en el brazo largo del cromosoma 10. Debido a esto, decidimos realizar el análisis de desequilibrio de ligamiento para comprobar si estos polimorfismos tienden a transmitirse conjuntamente o por el contrario son independientes. Tal y como se muestra en la Tabla 41, en nuestra población de estudio observamos que el rango de discrepancias entre los polimorfismos Ile349Val en el gen *ADH1C* y los polimorfismos Arg48His y Arg370Cys en el gen *ADH1B* es bastante elevado, por lo que a pesar de la cercanía de los genes, estos polimorfismos se transmiten unidos en el mejor de los casos en, aproximadamente el 56% de los individuos. Sin embargo, los polimorfismos Arg48His y Arg370Cys en el gen *ADH1B* están en desequilibrio de ligamiento con una probabilidad de discrepancias de 18,09%, por lo que tienden a transmitirse conjuntamente. Lo mismo observamos para los polimorfismos *RsaI*, *DraI* y *TaqI* en el gen *CYP2E1*, siendo el desequilibrio de ligamiento más fuerte en el caso de los polimorfismos *RsaI* y *DraI*, con una probabilidad de discrepancias del 10,41%. Sin embargo, debido a la baja frecuencia de estos polimorfismos en nuestra población de estudio, no hemos realizado análisis por haplotipos debido a un tamaño de muestra insuficiente.

Tabla 41. Análisis de ligamiento entre los polimorfismos en *ADH1C*, *ADH1B* y *CYP2E1*

		<i>ADH1B</i> Arg48His					<i>ADH1B</i> Arg370Cys		
		Arg/Arg	Arg/His	His/His			Arg/Arg	Arg/Cys	
<i>ADH1C</i> Ile349Val	Ile/Ile	516	156	11	<i>ADH1C</i> Ile349Val	Ile/Ile	660	12	
	Ile/Val	585	95	1		Ile/Val	667	4	
	Val/Val	170	8	0		Val/Val	177	0	
Probabilidad de discrepancia = 60,38%					Probabilidad de discrepancia = 56,32%				

		<i>CYP2E1</i> TaqI					<i>ADH1B</i> Arg370Cys		
		C/C	C/G	G/G			Arg/Arg	Arg/Cys	
<i>CYP2E1</i> RsaI	c1/c1	581	153	13	<i>ADH1B</i> Arg48His	Arg/Arg	1243	14	
	c1/c2	50	7	0		Arg/His	249	2	
	c2/c2	3	0	0		His/His	12	0	
Probabilidad de discrepancia = 27,14%						Probabilidad de discrepancia = 18,09%			

		<i>CYP2E1</i> DraI					<i>CYP2E1</i> DraI		
		D/D	D/C	C/C			D/D	D/C	C/C
<i>CYP2E1</i> RsaI	c1/c1	860	104	4	<i>CYP2E1</i> TaqI	C/C	638	146	9
	c1/c2	1	69	5		C/G	177	24	0
	c2/c2	0	0	4		G/G	15	0	0
Probabilidad de discrepancia = 10,41%					Probabilidad de discrepancia = 34,39%				

4.9.1 Interacción Gen-Gen

Debido a que los riesgos y protecciones obtenidos en este estudio son relativamente pequeños, decidimos llevar a cabo un análisis de interacción gen-gen para determinar si existe un efecto aditivo en la combinación de los polimorfismos en los genes estudiados en este trabajo.

Nuestros resultados sugieren que la combinación del genotipo Ile/Ile (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el genotipo D/D (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1* da lugar a un descenso del riesgo de cáncer de pulmón casi estadísticamente significativo (OR ajustada = 0,80; IC 95% = 0,59-1,08) (Tabla 46).

También podemos observar una posible interacción entre el gen *ADH1C* y el gen *MTHFR* de modo que, individuos portadores del alelo variante Val (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y portadores del alelo variante T

(supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, presentan un pequeño aumento del riesgo de cáncer de pulmón casi estadísticamente significativo (OR cruda = 1,21; IC 95% = 0,92-1,59). No obstante, dicha interacción desaparece al ajustar por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras, frutas y calorías (Kcal) (OR ajustada = 1,27; IC 95% = 0,87-1,85) (Tabla 47).

En el caso del gen *ADH1B* vemos una interacción con el gen *CYP2E1*, ya que la combinación de portadores del alelo variante His (supuesto alelo de riesgo) en el caso del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* y el genotipo homocigoto salvaje c1/c1 (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1*, se asocia con una disminución del riesgo de cáncer pulmón (OR ajustada = 0,56; IC 95% = 0,35-0,90) (Tabla 49).

También hallamos una interacción con el gen *MTHFR*. En este caso, portadores del alelo variante His (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* y el genotipo homocigoto salvaje C/C (supuesto alelo de no riesgo) para el polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, también se asocia con un menor riesgo de cáncer de pulmón casi estadísticamente significativo (OR ajustada = 0,61; IC 95% = 0,34-1,09) (Tabla 51).

Otra interacción que hemos encontrado se da entre el genotipo salvaje Arg/Arg (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B* y portadores del alelo variante T (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, de forma que la combinación de estos alelos supone un aumento del riesgo de cáncer de pulmón casi estadísticamente significativo (OR ajustada = 1,22; IC 95% = 0,92-1,62) (Tabla 55).

Por último, nuestros resultados también indican una interacción entre el gen *MTHFR* y el gen *CYP2E1*, de modo que la combinación del genotipo homocigoto salvaje C/C (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo C677T presente en el gen *MTHFR* con portadores del alelo variante c2 (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1* conlleva una disminución del riesgo de cáncer de pulmón casi estadísticamente significativa (OR ajustada = 0,35; IC 95% = 0,12-1,03) (Tabla 57).

No hemos encontrado ninguna interacción en el resto de combinaciones de genotipos estudiados en este apartado. Es importante destacar que en algunos casos no

se pudo obtener valores de OR debido a la ausencia de individuos en algunas de las combinaciones analizadas.

Tabla 42. Análisis de interacción entre Ile349Val en *ADH1C* y Arg48His en *ADH1B*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1C-ADH1B</i>					
Ile/Val+Val/Val-Arg/Arg	385 (48,4%)	370 (49,5%)	1,00	1,00	0,650
Ile/Val+Val/Val-Arg/His+His/His	53 (6,7%)	51 (6,8%)	1,00 [0,66-1,51]	0,82 [0,46-1,46]	
Ile/Ile-Arg/Arg	273 (34,3%)	243 (32,5%)	1,08 [0,86-1,35]	0,98 [0,72-1,32]	
Ile/Ile-Arg/His+His/His	84 (10,6%)	83 (11,1%)	0,97 [0,70-1,36]	0,72 [0,44-1,18]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 43. Análisis de interacción entre Ile349Val en *ADH1C* y Arg370Cys en *ADH1B*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1C-ADH1B</i>					
Ile/Val+Val/Val-Arg/Arg	431 (55,1%)	413 (56,0%)	1,00	1,00	0,996
Ile/Val+Val/Val-Arg/Cys+Cys/Cys	1 (0,1%)	3 (0,4%)	0,32 [0,03-3,09]	0,66 [0,06-7,32]	
Ile/Ile-Arg/Arg	344 (44,0%)	316 (42,8%)	1,04 [0,85-1,28]	0,95 [0,72-1,26]	
Ile/Ile-Arg/Cys+Cys/Cys	6 (0,8%)	6 (0,8%)	0,96 [0,31-3,00]	0,57 [0,12-2,68]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 44. Análisis de interacción entre Ile349Val en *ADH1C* y TaqI en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1C-CYP2E1</i>					
Ile/Val+Val/Val-C/G+G/G	64 (11,7)	58 (12,5)	1,00	1,00	0,915
Ile/Val+Val/Val-C/C	234 (42,9)	198 (42,6)	1,07 [0,72-1,60]	1,05 [0,62-1,77]	
Ile/Ile-C/G+G/G	47 (8,6)	47 (10,1)	0,91 [0,53-1,55]	0,88 [0,44-1,76]	
Ile/Ile-C/C	201 (36,8)	162 (34,8)	1,12 [0,74-1,70]	0,93 [0,55-1,59]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 45. Análisis de interacción entre Ile349Val en *ADH1C* y *Rsal* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1C-CYP2E1</i>					
Ile/Val+Val/Val-c1/c1	275 (51,1)	261 (51,1)	1,00	1,00	0,476
Ile/Val+Val/Val-c1/c2+c2/c2	20 (3,8)	20 (3,9)	0,95 [0,50-1,81]	0,70 [0,30-1,64]	
Ile/Ile-c1/c1	224 (41,6)	210 (41,1)	1,01 [0,79-1,30]	0,79 [0,56-1,12]	
Ile/Ile-c1/c2+c2/c2	19 (3,5)	20 (3,9)	0,90 [0,47-1,73]	0,86 [0,36-2,02]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 46. Análisis de interacción entre Ile349Val en *ADH1C* y *Dral* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1C-CYP2E1</i>					
Ile/Val+Val/Val-D/D	381 (45,6)	349 (46,0)	1,00	1,00	0,062
Ile/Ile+Ile/Val-D/C+C/C	82 (8,8)	80 (10,5)	0,94 [0,67-1,32]	0,74 [0,46-1,18]	
Ile/Ile-D/D	301 (36,1)	271 (35,8)	1,02 [0,82-1,27]	0,80 [0,59-1,08]	
Ile/Ile-D/C+C/C	71 (8,5)	58 (7,7)	1,12 [0,77-1,63]	1,17 [0,71-1,93]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 47. Análisis de interacción entre Ile349Val en *ADH1C* y C677T en *MTHFR*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1C-MTHFR</i>					
Ile/Val+Val/Val-C/C	165 (21,0%)	177 (23,9)	1,00	1,00	0,796
Ile/Val+Val/Val-C/T+T/T	271 (34,5%)	241 (32,5)	1,21 [0,92-1,59]	1,27 [0,87-1,85]	
Ile/Ile-C/C	156 (19,8%)	139 (18,7)	1,20 [0,88-1,65]	0,98 [0,64-1,50]	
Ile/Ile-C/T+T/T	194 (24,7%)	185 (24,9)	1,12 [0,84-1,51]	1,15 [0,77-1,72]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 48. Análisis de interacción entre Arg48His en *ADH1B* y *TaqI* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-CYP2E1</i>					
Arg/Arg-C/G+G/G	92 (16,8)	84 (18,1)	1,00	1,00	0,325
Arg/Arg-C/C	363 (66,5)	297 (63,9)	1,12 [0,80-1,56]	0,96 [0,63-1,47]	
Arg/His+His/His- C/G+G/G	19 (13,2)	21 (13,5)	1,04 [0,67-1,64]	0,80 [0,44-1,45]	
Arg/His+His/His-C/C	72 (3,5)	63 (4,5)	0,83 [0,41-1,65]	0,46 [0,18-1,22]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 49. Análisis de interacción entre Arg48His en *ADH1B* y *RsaI* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-CYP2E1</i>					
Arg/Arg-c1/c1	422 (78,4)	380 (74,4)	1,00	1,00	0,023
Arg/Arg-c1/c2+c2/c2	31 (5,8)	35 (6,8)	0,80 [0,48-1,32]	0,64 [0,32-1,25]	
Arg/His+His/His-c1/c1	77 (14,3)	91 (17,8)	0,76 [0,55-1,06]	0,56 [0,35-0,90]	
Arg/His+His/His- c1/c2+c2/c2	8 (1,5)	5 (1,0)	1,44 [0,47-4,45]	1,99 [0,49-8,06]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 50. Análisis de interacción entre Arg48His en *ADH1B* y *DraI* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-CYP2E1</i>					
Arg/Arg-D/D	544 (68,7)	501 (67,3)	1,00	1,00	0,504
Arg/Arg-D/C+C/C	112 (14,1)	110 (14,8)	0,94 [0,70-1,25]	0,96 [0,65-1,43]	
Arg/His+His/His-D/D	105 (13,3)	107 (14,4)	0,90 [0,67-1,21]	0,73 [0,47-1,12]	
Arg/His+His/His- D/C+C/C	31 (3,9)	26 (3,5)	1,10 [0,64-1,88]	0,90 [0,43-1,85]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 51. Análisis de interacción entre Arg48His en *ADH1B* y C677T en *MTHFR*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-MTHFR</i>					
Arg/Arg-C/C	268 (34,1)	254 (34,2)	1,00	1,00	0,402
Arg/Arg-C/T+T/T	384 (48,9)	355 (47,8)	1,03 [0,82-1,28]	1,16 [0,85-1,57]	
Arg/His+His/His-C/C	53 (6,7)	62 (8,4)	0,81 [0,54-1,22]	0,61 [0,34-1,09]	
Arg/His+His/His-C/T+T/T	81 (10,3)	71 (9,6)	1,08 [0,75-1,55]	1,01 [0,60-1,69]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 52. Análisis de interacción entre Arg370Cys en *ADH1B* y TaqI en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-CYP2E1</i>					
Arg/Arg-C/G+G/G	110 (20,2)	104 (22,4)	1,00	1,00	0,172
Arg/Arg-C/C	431 (78,9)	355 (76,3)	1,15 [0,85-1,55]	1,09 [0,73-1,61]	
Arg/Cys+Cys/Cys-C/G+G/G	1 (0,2)	1 (0,2)	0,95 [0,06-15,41]	3,02 [0,17-52,33]	
Arg/Cys+Cys/Cys-C/C	4 (0,7)	5 (1,1)	0,76 [0,20-2,90]	0,15 [0,01-1,63]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 53. Análisis de interacción entre Arg370Cys en *ADH1B* y RsaI en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-CYP2E1</i>					
Arg/Arg-c1/c1	491 (92,0)	461 (90,9)	1,00	1,00	-
Arg/Arg-c1/c2+c2/c2	39 (7,3)	40 (7,9)	0,92 [0,58-1,45]	0,85 [0,46-1,56]	
Arg/Cys+Cys/Cys-c1/c1	4 (0,7)	6 (1,2)	0,63 [0,18-2,23]	0,54 [0,09-3,27]	
Arg/Cys+Cys/Cys-c1/c2+c2/c2	0 (0,0)	0 (0,0)	----- ^b	----- ^b	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

^bLas ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

Tabla 54. Análisis de interacción entre Arg370Cys en *ADH1B* y *Dral* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-CYP2E1</i>					
Arg/Arg-D/D	633 (81,1)	593 (80,6)	1,00	1,00	1,000
Arg/Arg-D/C+C/C	140 (18,0)	134 (18,2)	0,98 [0,75-1,27]	0,99 [0,69-1,41]	
Arg/Cys+Cys/Cys-D/D	6 (0,8)	9 (1,2)	0,62 [0,22-1,77]	0,39 [0,09-1,67]	
Arg/Cys+Cys/Cys-D/C+C/C	1 (0,1)	0 (0)	----- ^b	----- ^b	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

^bLas ORs no han podido ser calculadas debido a la falta de información en las variables de ajuste

Tabla 55. Análisis de interacción entre Arg370Cys en *ADH1B* y C677T en *MTHFR*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>ADH1B-MTHFR</i>					
Arg/Arg-C/C	319 (40,9)	311 (42,2)	1,00	1,00	0,389
Arg/Arg-C/T+T/T	455 (58,3)	417 (56,6)	1,06 [0,87-1,31]	1,22 [0,92-1,62]	
Arg/Cys+Cys/Cys-C/C	1 (0,1)	5 (0,7)	0,19 [0,02-1,69]	0,27 [0,02-3,14]	
Arg/Cys+Cys/Cys-C/T+T/T	5 (0,7)	4 (0,5)	1,22 [0,32-4,59]	1,13 [0,22-5,76]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 56. Análisis de interacción entre C677T en *MTHFR* y *TaqI* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>MTHFR-CYP2E1</i>					
C/C-C/G+G/G	51 (9,4)	46 (9,9)	1,00	1,00	0,543
C/C-C/C	174 (32,0)	159 (34,3)	0,99 [0,63-1,55]	0,92 [0,51-1,66]	
C/T+T/T-C/G+G/G	260 (47,8)	200 (43,1)	0,90 [0,53-1,55]	1,06 [0,53-2,15]	
C/T+T/T-C/C	59 (10,8)	59 (12,7)	1,17 [0,76-1,82]	1,26 [0,71-2,24]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 57. Análisis de interacción entre C677T en *MTHFR* y *Rsal* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>MTHFR-CYP2E1</i>					
C/C-c1/c1	202 (37,9)	205 (40,5)	1,00	1,00	0,040
C/C-c1/c2+c2/c2	12 (2,2)	16 (3,2)	0,76 [0,35-1,65]	0,35 [0,12-1,03]	
C/T+T/T-c1/c1	292 (54,8)	261 (51,6)	1,14 [0,88-1,47]	1,16 [0,82-1,64]	
C/T+T/T-c1/c2+c2/c2	27 (5,1)	24 (4,7)	1,14 [0,64-2,05]	1,50 [0,71-3,18]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

Tabla 58. Análisis de interacción entre C677T en *MTHFR* y *Dral* en *CYP2E1*

Nº de alelos de riesgo	Casos n (%)	Controles n (%)	OR cruda [IC 95%]	OR ajustada ^a [IC 95%]	p interacción
<i>MTHFR-CYP2E1</i>					
C/C-D/D	263 (33,6)	252 (34,1)	1,00	1,00	0,979
C/C-D/C+C/C	56 (7,1)	62 (8,4)	0,87 [0,58-1,29]	0,99 [0,58-1,70]	
C/T+T/T-D/D	378 (48,3)	353 (47,8)	1,03 [0,82-1,29]	1,24 [0,90-1,69]	
C/T+T/T-D/C+C/C	86 (11,0)	72 (9,7)	1,14 [0,80-1,64]	1,25 [0,77-2,04]	

^aAjustada por edad, género, paquetes-año, alcohol (g/día), verduras (4 cat.), frutas (4 cat.), calorías (Kcal)

5. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha puesto de manifiesto de una manera cada vez más evidente que en el proceso de desarrollo y progresión del cáncer influyen un gran número de factores, no solamente factores ambientales o de estilos de vida, sino también factores genéticos individuales que contribuyen a que algunos individuos tengan una mayor o menor susceptibilidad genética al desarrollo de esta enfermedad.

Hay una clara evidencia de que el tabaco provoca cáncer de pulmón, pero gran parte de la etiología del cáncer de pulmón no es bien conocida ni entendida, como el por qué algunos individuos que son no fumadores desarrollan cáncer de pulmón y porque solo una fracción de los fumadores desarrolla dicha neoplasia. Se ha sugerido que en estas variaciones, el alcohol puede jugar un papel importante. Así, en 1988 la IARC concluye que “hay suficientes evidencias de que las bebidas alcohólicas son cancerígenas en humanos”. El alcohol puede actuar como agente prooxidante en los tejidos, incluido el tejido pulmonar y en lípidos, incluida la membrana lipídica pulmonar (Thurman, 1973; Knecht y col., 1990; Manautou y Carlson, 1991; Kukielka y Cederbaum, 1992; Nachiappan y col., 1994; Albano y col., 1996; Song, 1996; Yang y col., 2002).

El consumo crónico de alcohol y tabaco son los principales factores de riesgo para los cánceres del tracto aerodigestivo superior, incluyendo orofaringe, hipofaringe, laringe y esófago (Pöschl y Seitz, 2004; Vioque y col., 2008). Además, la ingesta crónica de alcohol, incluso a dosis moderadas, aumenta la carcinogénesis en el colon, recto, estómago, hígado, sistema nervioso central y mama, especialmente en las personas con mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer (Baan y col., 2007; de Menezes y col., 2013; Bagnardi y col., 2015). Además, cada vez hay más evidencias de que el consumo de alcohol está asociado con cáncer de próstata, páncreas y melanoma (Seitz y col., 1990; Bagnardi y col., 2015).

El primer metabolito de la oxidación del alcohol, el acetaldehído, es un conocido compuesto carcinogénico puesto que la IARC ha clasificado el acetaldehído presente en las bebidas alcohólicas como “carcinógeno en humanos” (IARC, 2011). Se han reunido pruebas de que el acetaldehído es predominantemente responsable de la carcinogénesis asociada al alcohol, dado que el acetaldehído, a diferencia del alcohol, es un compuesto que es citotóxico, genotóxico, mutagénico y clastogénico ya a bajas concentraciones (por debajo de 1 mM) (Obe y Ristow, 1979). El acetaldehído se une al ADN y proteínas, destruye el folato y resulta en hiperregeneración secundaria. Se ha demostrado que el

acetaldehído da lugar a intercambios entre cromáticas hermanas “in vitro” en células humanas y de mamíferos (Obe y Anderson, 1987) y aumenta la formación de micronúcleos, un conocido biomarcador tumoral, en linfocitos humanos (Ishikawa y col., 2003). Se ha propuesto que los efectos del acetaldehído mencionados anteriormente podrían ser originados por la formación de aductos de ADN debidos al acetaldehído (Brooks y Theruvathu, 2005) (Figura 7). Recientemente, se ha visto que estos aductos de acetaldehído (futuro potencial biomarcador de carcinogénesis) se formaban incluso durante un consumo moderado-intenso de alcohol en humanos (Balbo y col., 2012).

Además del acetaldehído, otros compuestos contenidos en las bebidas alcohólicas pueden tener efectos carcinogénicos. Otros mecanismos propuestos por los cuales el alcohol puede ejercer su efecto carcinogénico son: daño por radicales libres, impedimento de los procesos de reparación del ADN, actuando como solvente para los carcinógenos procedentes del tabaco y la inducción de enzimas relacionadas con el metabolismo de carcinógenos (Seitz y col., 1981) (Figura7).

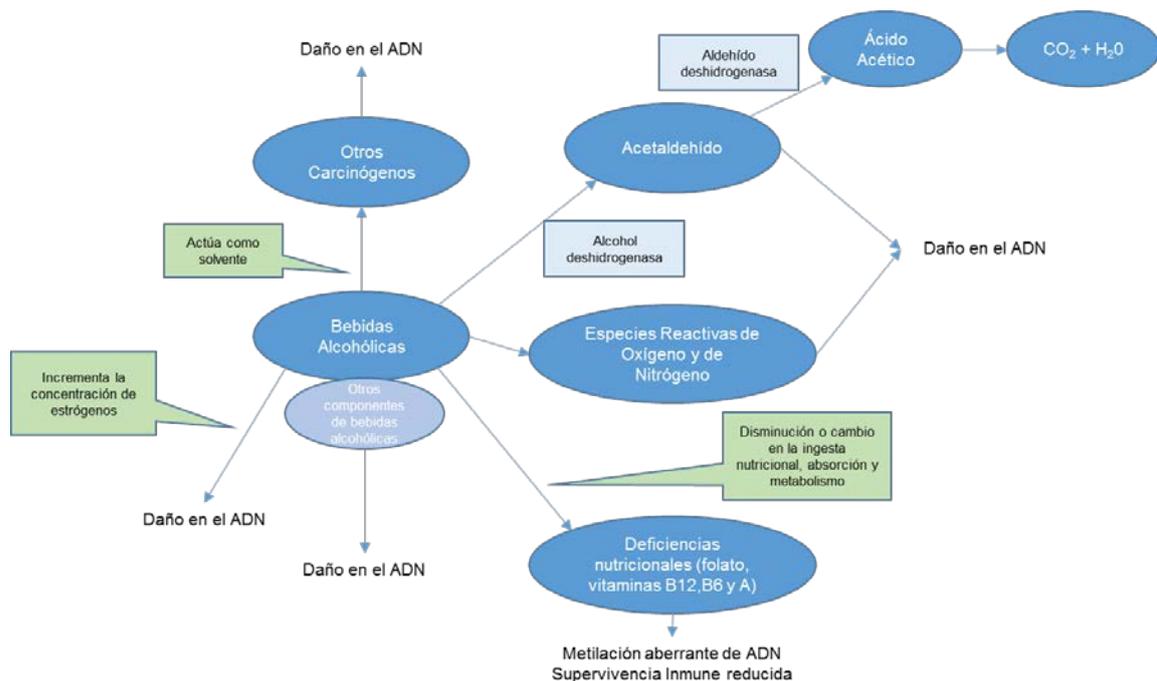


Figura 7: Posibles mecanismos del alcohol asociados con la carcinogénesis (Adaptado de Uehara y Kiyohara, 2010)

Los datos obtenidos en este estudio indican un efecto protector, casi estadísticamente significativo, a desarrollar cáncer de pulmón en individuos con un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día. Esta asociación también ha sido observada en el estudio EPIC, realizado en una población europea, donde observaron un menor riesgo de cáncer de pulmón en individuos con un consumo moderado de alcohol (5-14,9 g/día) cuando los comparaban con individuos con un consumo de alcohol de 0,1-4,9 g/día (Hazard Ratio = 0,76; IC 95% = 0,63-0,90) (Rohrmann y col., 2006). Los mismos resultados fueron hallados en el estudio EAGLE, llevado a cabo en una población italiana, donde un consumo de alcohol de 5-14,9 g/día disminuye el riesgo de cáncer de pulmón en comparación con un consumo de alcohol de 0,1-4,9 g/día (OR ajustada = 0,85; IC 95% = 0,64-1,14) (Bagnardi y col., 2009). Este efecto puede estar relacionado con la asociación inversa entre el consumo moderado de alcohol y la mortalidad que ha sido publicada en numerosas investigaciones (White, 1999). Se cree que los efectos antiinflamatorios del consumo moderado de alcohol podrían contribuir a este efecto, dado que se ha demostrado que una ingesta moderada de alcohol está relacionada con concentraciones plasmáticas más bajas de distintos marcadores sistémicos de inflamación en comparación con un elevado consumo o no consumo (Imhof y col., 2004), así como con un daño oxidativo reducido (Bianchini y col., 2001; Yoshida y col., 2001), y se ha discutido acerca del papel de los componentes antioxidantes de las bebidas alcohólicas en la promoción y progresión tumoral (Bianchini y Vainio, 2003). Además, pequeñas cantidades de alcohol pueden ser necesarias para la inducción de las enzimas de protección, tales como las enzimas reparadoras de ADN o las enzimas detoxificantes de carcinógenos (Woodson y col., 1999). Por tanto, es posible que los efectos beneficiosos del consumo de bajo a moderado de alcohol contrarresten la función de promoción de cáncer del etanol y sus metabolitos.

Sin embargo, un análisis reciente del estudio "Million Women Study" del Reino Unido encontró que, durante siete años de seguimiento, mujeres que bebían entre 7 y 14 bebidas por semana tenían un pequeño aumento en el riesgo de todos los cánceres (Riesgo Relativo (RR) = 1,05; IC 95% = 1,03-1,07), comparado con las que bebían menos de dos bebidas por semana (Allen y col., 2009). Otro reciente estudio también ha encontrado que un consumo de alcohol de ligero a moderado (un consumo de alcohol entre 5-14,9 g/día tanto para hombres como para mujeres) estaba asociado con un pequeño aumento de riesgo de cáncer en hombres y en mujeres (RR = 1.05; IC 95% = 0.97-1.12; RR = 1,04; IC 95% = 1,00-1,09, respectivamente) (Cao y col., 2015).

En este trabajo también hemos observado que un consumo de alcohol ≥ 30 g/día aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, aunque no es estadísticamente significativo. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Minegishi y col., Rohrmann y col., Freudenheim y col., Korte y col. y Bagnardi y col. (Korte y col., 2002; Freudenheim y col., 2005; Rohrmann y col., 2006; Minegishi y col., 2007; Bagnardi y col., 2009). No podemos descartar una confusión residual por el tabaco, ya que no hemos podido evaluar el efecto del alcohol en no fumadores debido al tamaño de muestra insuficiente en nuestra población en este subgrupo. No obstante, de acuerdo con tres revisiones (Bandera y col., 2001; Boffetta y Hashibe, 2006; de Menezes y col., 2013), tres meta-análisis (Korte y col., 2002; Uehara y Kiyohara., 2010; Bagnardi y col., 2015) y un pooled análisis (Freudenheim y col., 2005), la evidencia actual es insuficiente para confirmar una asociación entre el alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón.

El análisis de la interacción entre el alcohol y el tabaco que se ha hecho en esta tesis muestra un claro efecto sinérgico entre ambos con respecto al riesgo de cáncer de pulmón, de modo que una ingesta de alcohol ≥ 30 g/día junto con un consumo de tabaco ≥ 37 paquetes/año aumenta el riesgo de cáncer de pulmón 14 veces. Numerosos estudios apoyan estos resultados dado que han demostrado que el alcohol parece desempeñar un efecto sinérgico con el tabaco (Tuyns, 1978; Drecker y Col., 1982; Hashibe y col., 2007; Seitz y Stickel., 2007; Bagnardi y col., 2009; Toh y col., 2010). La posible explicación para el efecto sinérgico encontrado entre el consumo de alcohol y el tabaco podría ser que el alcohol actúa como solvente para los carcinógenos presentes en el tabaco, facilitando su penetración (Boffetta y Hashibe, 2006). También se ha demostrado en alcohólicos, que los fumadores tienen una eliminación más rápida del etanol que los no fumadores, sugiriendo una base biológica para la correlación del tabaco y el consumo del alcohol (Schoedel y Tyndale, 2003). Además, el alcohol podría aumentar los efectos carcinogénicos del humo del tabaco en los tejidos induciendo la actividad de las enzimas citocromo P-450, las cuales a su vez pueden activar procarcinógenos presentes en las bebidas alcohólicas (Pöschl y Seitz, 2004). La presencia de inductores y de substratos precarcinógenos de la CYP2E1 en el humo del tabaco podría explicar el hecho de que el abuso del alcohol y el tabaquismo interactúan sinérgicamente como factores etiológicos para el cáncer (Pottern y col., 1981; IARC, 1986).

Por otro lado, el consumo de frutas y verduras está relacionado con un menor riesgo de cáncer de pulmón, próstata, vejiga, esófago y estómago. Esto se debe a que

son una fuente de sustancias fitoquímicas que tienen muchas propiedades beneficiosas, como su acción anti-inflamatoria y antioxidante, la reducción de la toxicidad de las sustancias químicas dañinas, el control de los niveles hormonales y el crecimiento celular (Divisi y col., 2006; WCRF, 2007). En este trabajo hemos realizado un análisis de interacción entre el consumo de verduras y el alcohol respecto al riesgo de cáncer de pulmón y hemos encontrado que un consumo de verduras ≥ 116.65 g/día disminuye el riesgo de cáncer de pulmón en todas las categorías de consumo de alcohol. Observamos este mismo efecto protector frente al riesgo de cáncer de pulmón en todas las categorías de consumo de alcohol con una ingesta de frutas $\geq 233,13$ g/día. Nuestros resultados sugieren que un elevado consumo de frutas y verduras, debido a sus propiedades beneficiosas, podría neutralizar parte del efecto dañino producido por la ingesta de alcohol. Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto el efecto beneficioso de consumir muchas frutas y verduras (Feskanich y col., 2000; Neuhouser y col., 2003; Riboli y Norat., 2003; Smith-Warner y col., 2003; Mannisto y col., 2004; Valdes-Ramos y Benitez-Arciniega, 2007; Gallicchio y col., 2008; Wang, 2015).

El alcohol y los principales enzimas implicados en su metabolismo constituyen un factor importante en el proceso de la carcinogénesis. El consumo de folato y su metabolismo y el consumo de frutas y verduras pueden también influir notablemente en el efecto que puede ejercer el alcohol. Aunque los genes implicados en estos procesos han sido estudiados anteriormente para detectar su influencia en el desarrollo del cáncer de pulmón, en la mayoría de los casos se ha limitado a dos o tres genes por estudio, y éstos suelen tener limitaciones tales como el pequeño tamaño de muestra y la heterogeneidad de los pacientes incluidos en los estudios. En este trabajo se planteó un estudio que pudiera dar respuestas consistentes apoyándose en su gran tamaño, la homogeneidad de los enfermos y la normalización de determinación de prevalencias de exposición. Para ello, en este estudio caso-control se han controlado los principales factores de riesgo medioambientales (tabaco, alcohol, frutas, verduras, calorías, género y edad), genéticos (agregación familiar) y clínicos (histología) para medir la asociación de polimorfismos en genes metabolizadores de alcohol (*ADH1B*, *ADH1C*, *CYP2E1*), acetaldehído (*ALDH2*) y folato (*MTHFR*), así como también del consumo de alcohol y folato y la susceptibilidad individual de incidencia de cáncer de pulmón.

Los polimorfismos estudiados en esta tesis constituyen polimorfismos funcionales en un único nucleótido (SNPs), ya que todos ellos provocan el cambio de aminoácido en

la proteína que codifican, de manera que la existencia del polimorfismo puede alterar la función normal de la proteína codificada por dicho gen. En este trabajo se han analizado 8 SNPs correspondientes a 5 genes diferentes (*ADH1B* Arg48His, *ADH1B* Arg370Cys, *ADH1C* Ile349Val, *ALDH2* Glu504Lys, *CYP2E1* RsaI, *CYP2E1* DraI, *CYP2E1* TaqI y *MTHFR* C677T). Los polimorfismos *DraI* y *TaqI* están ambos localizados en intrones. No obstante, el alelo variante del polimorfismo *DraI* ha sido relacionado con un mayor riesgo de desarrollar alcoholismo en japoneses (Iwahashi y col., 1998) y con la incidencia de cáncer de pulmón en una población japonesa (Uematsu y col., 1994). En el caso del polimorfismo *TaqI*, en un estudio en una población caucásica han observado que el grupo con enfermedad hepática alcohólica mostraban una frecuencia significativamente menor del alelo *TaqI* menos común (4,9%), en comparación con el grupo control sano (13,5%) (Wong y col., 2000).

La eficiencia en la conversión de etanol a acetaldehído y la posterior oxidación a acetato es determinada principalmente por la actividad de ADH y ALDH. Además, el consumo crónico de alcohol conduce a una inducción de la CYP2E1 microsomal, que es capaz de metabolizar el alcohol a acetaldehído. El acetaldehído y las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por la actividad CYP2E1 pueden inducir lesiones en el ADN, que si se dejan sin reparar pueden iniciar la carcinogénesis. Además, como ya hemos mencionado, el acetaldehído de las bebidas alcohólicas ha sido clasificado como “carcinógeno en humanos” por la IARC. Por todo ello, variantes genéticas en los genes que codifican estas enzimas que resultan en diferencias funcionales de la actividad enzimática, dan lugar a diferencias en la exposición a acetaldehído entre los bebedores. Diferencias en el metabolismo del etanol que resultan de estos polimorfismos en las enzimas podrían afectar a la etiología del cáncer entre los bebedores. Es más, el consumo de alcohol podría interactuar con otros genes que codifican enzimas implicadas en diferentes vías biológicas tales como el metabolismo del folato y podría afectar al riesgo de cáncer (Druesne-Pecollo, 2009); en concreto, podrían tener un papel clave en cuanto a la susceptibilidad genética individual al desarrollo de cáncer de pulmón.

ADHs:

Entre las siete alcohol deshidrogenasas (ADH) presentes en humanos (Edenberg y col., 1997), la *AHD1B* y *ADH1C* presentan polimorfismos funcionales que afectan al metabolismo del alcohol. El primer polimorfismo analizado en este trabajo es el

polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B*, se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio y la frecuencia alélica del alelo variante His en los controles de nuestra población es de 0,09, similar a la frecuencia encontrada en otros estudios en poblaciones españolas (Panés y col., 1989; Vidal y col., 1993; Vidal y col., 2004) y concuerda con la frecuencia esperada en poblaciones europeas ($\leq 0,10$) (Brennan y col., 2004; Quertemont, 2004). En este caso, los individuos portadores del alelo variante His parecen tener cierta protección frente al desarrollo de cáncer de pulmón, aunque no es estadísticamente significativo. Los resultados obtenidos no concuerdan con la hipótesis propuesta en esta tesis y con lo esperado desde el punto de vista biológico, ya que el alelo variante His que codifica una enzima que tiene una $V_{m\acute{a}x}$ 40 veces mayor que la enzima codificada por el alelo salvaje Arg, convierte rápidamente el etanol en acetaldehído, lo que daría lugar a un aumento del tiempo que el acetaldehído permanece en contacto con los tejidos incrementando el nivel de acetaldehído en ellos (Druesne-Pecollo y col., 2009). La posible explicación de los resultados encontrados podría deberse a que, como hemos mencionado anteriormente, los individuos portadores del alelo variante His, al convertir rápidamente el etanol en acetaldehído, conduce a una rápida acumulación de acetaldehído tras el consumo de alcohol, lo cual da lugar a efectos secundarios tóxicos tales como el síndrome “flusing” con sudoración, ritmo cardiaco acelerado (taquicardia), náuseas y vómitos. Estos efectos adversos ejercen un efecto protector contra el consumo excesivo y crónico de alcohol (individuos con este alelo normalmente beben poco o nada de alcohol) y, por consiguiente, también parece que podría proteger frente al desarrollo de cáncer relacionado con alcohol (Seitz y Stickel, 2010). Otra posible hipótesis es que el rápido metabolismo inicial puede dar lugar a un pico en la exposición a acetaldehído, induciendo mecanismos alternativos para purificar (aclarar) este pico. Por otro lado, un metabolismo inicial más moderado puede no inducir tales mecanismos, resultando en un mayor exposición general (Hashibe y col., 2006).

En el caso del polimorfismo Arg48His, este trabajo constituye el primer estudio que determina la posible contribución de este polimorfismo al riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Por otro lado, el efecto de este polimorfismo sobre el riesgo de otros tipos de cáncer es controvertido y podemos encontrar resultados dispares en la bibliografía.

En un meta-análisis de cáncer del tracto aerodigestivo superior que incluye 8.539 casos y 15.713 controles, la presencia del alelo Arg se ha asociado con un mayor riesgo a desarrollar cáncer del tracto aerodigestivo superior (Pooled OR = 1,66; IC 95% = 1,54-

1,79 y Pooled OR = 3,47; IC 95% = 2,76-4,36 para los genotipos His/Arg y Arg/Arg comparados con el genotipo His/His, respectivamente) (Guo, 2012). En otro meta-análisis con 8.906 casos con cáncer esofágico y 13.712 controles, observaron que individuos con el genotipo salvaje Arg/Arg tenían un aumento del riesgo de cáncer esofágico en 2,77 veces, comparados con individuos portadores de los genotipos Arg/His e His/His (Zhang, 2014).

Sin embargo, un estudio caso-control llevado a cabo en hombres en una población china, encontró que el genotipo His/His daba lugar a un aumento moderado del riesgo de cáncer colorrectal en comparación con los genotipos Arg/His y Arg/Arg (OR ajustada = 1,60; IC 95% = 1,08-2,36)(Gao y col., 2008).

Por otro lado, un meta-análisis que incluye 518 casos de carcinoma hepatocelular y 607 controles concluyó que el polimorfismo Arg48His no está asociado con la susceptibilidad de cáncer hepatocelular (Shuzhen y col., 2015). En relación al cáncer gástrico, un meta-análisis de 7 estudios caso-control con un total de 2.563 casos y 4.192 controles, no encontró asociación alguna entre el polimorfismo Arg48His y el riesgo de cáncer gástrico (Wang y col., 2014).

En nuestros resultados también encontramos que el alcohol modifica el efecto del polimorfismo Arg48His de modo que, individuos con genotipo homocigoto salvaje Arg/Arg con un consumo de alcohol de 0,1-9,9 g/día tienen un menor riesgo de cáncer de pulmón, mientras que individuos portadores del alelo variante His con un consumo de alcohol de 10-29,9 g/día tienen 3 veces más riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Esto podría deberse a que, en el caso de los individuos con genotipo Arg/Arg, se podría estar reflejando el posible efecto beneficioso de un consumo bajo-moderado de alcohol. En el caso de los individuos portadores del alelo variante His, el aumento de riesgo encontrado podría deberse a que la cantidad de alcohol consumida podría no ser tan alta como para desencadenar el síndrome “flushing”, por lo que estos individuos no desarrollarían aversión al alcohol y, al metabolizar el alcohol más rápidamente, estarían más tiempo expuestos a sus efectos cancerígenos. Otra posible explicación es que los efectos adversos del “flushing” disminuyen en intensidad tras el consumo de alcohol en individuos con un historial de bebedores habituales o grandes bebedores.

En un estudio caso-control de cáncer colorrectal llevado a cabo en hombres en una población china también encontraron que individuos bebedores con el genotipo His/His tenían un mayor riesgo de cáncer colorrectal (OR ajustada = 3.44; IC 95% = 1.84-6.42) (Gao y col., 2008).

No obstante, tanto un meta-análisis realizado para cáncer de tracto aerodigestivo superior como en un meta-análisis de cáncer de esófago, encontraron que bebedores con genotipo Arg/Arg tenían un mayor riesgo de desarrollar estos cánceres (Guo y col., 2012; Zhang y col., 2014).

En el análisis estratificado de este polimorfismo encontramos que individuos menores de 55 años portadores del alelo variante His tienen un mayor riesgo de cáncer de pulmón. Sin embargo, en individuos con una edad comprendida entre los 55 y 69, el alelo variante His parece ejercer un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón en este grupo de individuos. Desde el punto de vista biológico, no encontramos un razonamiento plausible que explique los resultados obtenidos.

El polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B* también se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio. La frecuencia alélica del alelo variante Cys en los controles de nuestra población es de 0,006, y dicha frecuencia concuerda con lo que podríamos esperar dado que este alelo ha sido identificado sólo en poblaciones con ascendencia africana (Iron y col., 1992; Thomasson y col., 1995; Viljoen y col., 2001; Wall y col., 2003; Ehlers y col., 2007). En nuestros resultados observamos que individuos portadores del alelo variante Cys parecen tener un menor riesgo de cáncer de pulmón, aunque los intervalos de confianza son muy amplios. En nuestra hipótesis inicial esperábamos encontrar un mayor riesgo de cáncer de pulmón asociado al alelo Cys, dado que codifica un enzima muy activa y lo que se espera es que genere acetaldehído más rápidamente debido a su mayor actividad. Por ello, individuos con la isoenzima más activa (Cys/Cys) tendrían un mayor riesgo de daño tisular causado por la ingesta de alcohol debido a un aumento de la acumulación de acetaldehído, ya que esto supondría una mayor exposición a los efectos cancerígenos del acetaldehído. Sin embargo, la explicación a posteriori dados los resultados que hemos obtenido podría ser que, como ya hemos explicado para el caso del alelo variante His en el polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B*, el acetaldehído al acumularse tan rápidamente produce unos efectos adversos englobados bajo el término “flusing” de forma que, individuos con el alelo variante Cys

podrían desarrollar una intolerancia o aversión al alcohol, lo cual les podría proteger frente al desarrollo de cáncer asociado con el alcohol (Seitz y Becker, 2007). Los resultados que podemos encontrar en la literatura apoyan nuestra teoría de que el alelo Cys podría afectar a la conducta de beber (Ehlers y col., 2001). En un conjunto de familias afroamericanas, seleccionadas por tener varios miembros alcohólicos, se ha visto que el alelo variante Cys tiene un efecto protector significativo en el riesgo de alcoholismo (Edengerg y col., 2006). Este alelo también tiene un efecto protector frente al alcoholismo en indios del suroeste de California (Wall y col., 2003). Sin embargo no ha sido descrito en la literatura su posible asociación con el riesgo de cáncer.

El siguiente polimorfismo analizado en este estudio es el polimorfismo Ile349Val presente en el gen *ADH1C*, que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población y la frecuencia del alelo variante Val en los controles de nuestra población (0,34) es consistente con los datos publicados en otras poblaciones caucásicas (Bosron y Li, 1987; Roychoudhury y Nei, 1988; Weir y Cockerham, 1989; Gilder y col., 1993; Chen y col., 1999; Borràs y col., 2000; Brennan y col., 2004; Vidal y col., 2004). En nuestros análisis no hemos encontrado una asociación entre dicho polimorfismo y el riesgo de cáncer de pulmón, resultados que concuerdan con los obtenidos en dos estudios, uno llevado a cabo en la zona occidental del estado de Nueva York y el otro en una población japonesa, en los que no pudieron establecer ninguna asociación entre el polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón (Freudenheim y col., 2003; Minegishi y col., 2007). En términos bioquímicos el alelo variante Val, el alelo de menor actividad, da lugar a una reducción de 2,5 veces en la tasa de oxidación del alcohol a acetaldehído (Bosron y Li, 1986). Por el contrario, el alelo salvaje Ile y, consecuentemente, el genotipo salvaje Ile/Ile, está relacionado con un aumento del riesgo de cáncer de pulmón, ya que al producirse el acetaldehído (conocido agente cancerígeno) a mayor velocidad, conduciría a un aumento del nivel de acetaldehído sistémico y a un contacto más prolongado con los tejidos. (Saleem y col, 1984; Roberts y col, 1995; Seitz y col, 1998; Eriksson, 2001; Singletary y Gapstur, 2001; Boffetta y Hashibe, 2006).

También se ha descrito que tras la ingesta de alcohol, individuos con el alelo salvaje Ile tienen concentraciones de acetaldehído en sangre significativamente mayores en comparación con las concentraciones de los individuos que carecen de este alelo (Bosron y Li, 1986; Yamamoto y col, 1993) y se ha demostrado que los niveles de acetaldehído en el aliento son proporcionales a los niveles de acetaldehído en sangre. Por lo tanto, una

exposición a una mayor concentración de acetaldehído en el tracto respiratorio inferior puede jugar un papel crítico en la carcinogénesis relacionada con el alcohol. Esta hipótesis se ve reforzada con los resultados obtenidos por Yang y col., dónde individuos caucásicos con genotipo Ile/Ile mostraban una mayor actividad ADH en el pulmón y tenían una mayor presencia de aductos de ADN causados por el acetaldehído en el pulmón, que individuos con genotipo Val/Val. Por lo tanto, Yang y col. sugirieron que el alelo salvaje Ile podría ser considerado un factor de riesgo para cáncer de pulmón (Yang y col., 2002). Nuestros resultados sugieren que el alcohol modifica el efecto que ejerce el polimorfismo Ile349Val en el riesgo de cáncer de pulmón de forma que, un consumo de alcohol ≥ 30 g/día en individuos con genotipo homocigoto salvaje Ile/Ile aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, mientras que en individuos con genotipo homocigoto variante Val/Val con un consumo de alcohol ≥ 30 g/día, observamos una disminución del riesgo a desarrollar cáncer de pulmón. Estos resultados concuerdan con lo esperado desde el punto de vista biológico y con nuestra hipótesis, ya que, como hemos dicho anteriormente, los individuos con el genotipo Ile/Ile metabolizan el alcohol más rápidamente a acetaldehído que los individuos con el genotipo variante Val/Val, esto conlleva un aumento de los niveles de acetaldehído en los tejidos, permaneciendo más tiempo en contacto con ellos, pudiendo ejercer los efectos cancerígenos durante más tiempo, lo que lleva a un aumento de la carcinogénesis (Saleem y col, 1984; Roberts y col, 1995; Seitz y col, 1998; Eriksson, 2001; Singletary y Gapstur, 2001; Boffetta y Hashibe, 2006). No obstante, un prerrequisito para ello es el consumo de cierta cantidad de etanol que conduce a niveles de acetaldehído suficientemente altos para formar aductos de ADN (Seitz y Stickel, 2010). Estos resultados concuerdan con el estudio llevado a cabo por Minegishi y col. en una población japonesa, donde observan un mayor riesgo de cáncer de pulmón en individuos homocigotos Ile/Ile con un consumo de alcohol $>31,6$ g/día (OR = 1,88; IC 95% = 1,10-3,21). Sin embargo, dado que tenían muy pocos individuos portadores del alelo variante Val para analizar la asociación entre el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de pulmón para este alelo, consideraron que era inapropiado comparar los genotipos Ile/Ile y Val/Val (Minegishi y col., 2007). Otro estudio de cáncer de pulmón encontró también indicios de un mayor riesgo de cáncer de pulmón en individuos con genotipo Ile/Ile y un consumo elevado de alcohol (OR = 2,57; IC 95% = 0,82-8,00) (Freudenheim y col., 2003).

Este polimorfismo ha sido descrito previamente en la literatura y varios son los estudios que han analizado su asociación con el riesgo a desarrollar cáncer. Así, por

ejemplo, un estudio realizado en cáncer de esófago, hígado y cabeza y cuello, encontró que individuos con genotipo Ile/Ile, presentaban un riesgo relativo a desarrollar estos tipos de cáncer de 2,9, 3,6 y 2,2, respectivamente, comparados con individuos homocigotos Val/Val (Seitz y Becker, 2007). Otro estudio en individuos alcohólicos que incluye 187 casos con cánceres orofaríngeo, laríngeo, hipofaríngeo y esofágico, en los que su genotipo *ADH1C* fue comparado con controles alcohólicos (emparejados por edad) se encontró que, individuos homocigotos para el alelo Ile, tenían un mayor riesgo de cáncer (Stickel y col., 2003). Más aún, individuos homocigotos para el alelo Ile, se vio que tenían niveles elevados de acetaldehído en saliva (Li y col., 2001), lo que podría explicar por qué estos individuos tenían mayor riesgo de cáncer, dado que el acetaldehído entra en contacto directo con la mucosa, pudiendo causar inflamación y metaplasia del epitelio traqueal, retrasa la progresión del ciclo celular y aumenta la lesión celular asociada con hiperregeneración (Seitz y col., 2001). Por el contrario, en un meta-análisis más reciente de 22 estudios se observó un menor riesgo de cáncer de cabeza y cuello en portadores del alelo salvaje Ile (Meta-OR = 0,87; IC 95% = 0,76-0,99) (Chang y col., 2011).

Sin embargo, en un análisis realizado en 2012 que engloba 35 estudios caso-control no encontraron una asociación significativa entre el polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el riesgo de cáncer (Xue y col., 2012).

El hecho de que los genes *ADH1B* y *ADH1C* estén contiguos en su localización dentro del cromosoma 4 conduce a la hipótesis de que las variantes no se heredan independientemente. Han sido encontradas evidencias de un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos Ile349Val en el gen *ADH1C* y Arg48His en el gen *ADH1B* en europeos (Borràs y col., 2000) y en poblaciones de diferentes etnias (Thomasson y col., 1991; Chen y col., 1999; Osier y col., 1999; Risch y col., 2003). Sin embargo, tanto en un estudio realizado en una población española (Vidal y col., 2004), como en otro estudio llevado a cabo en una población caucásica (Risch y col., 2003), no encuentran este desequilibrio de ligamiento. Nuestros resultados muestran que el polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* no se encuentran en desequilibrio de ligamiento. Lo mismo ocurre en el caso del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el polimorfismo Arg370Cys en el gen *ADH1B*. Por otro lado, observamos que el polimorfismo Arg48His y el polimorfismo Arg370Cys, ambos en el gen *ADH1B*, se encuentran en desequilibrio de ligamiento en nuestra población.

ALDH:

El siguiente paso en el metabolismo del alcohol tras su oxidación a acetaldehído, es la oxidación del acetaldehído a acetato por la ALDH2.

El polimorfismo Glu504Lys en el gen *ALDH2*, no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio. Todos los individuos incluidos en este análisis presentan el genotipo homocigoto salvaje Glu/Glu. Estos datos concuerdan con otros publicados para poblaciones caucásicas, donde la frecuencia del alelo variante Lys oscila entre el 0% y el 0,2% (Li y col., 2008) y con un estudio en una población española (Vidal y col., 2004). Por este motivo, no hemos podido establecer ningún tipo de asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer de pulmón en nuestra población de estudio.

CYP2E1:

Aunque la vía principal de oxidación del alcohol es la vía de las ADHs, cuando el consumo de alcohol es elevado o crónico, el sistema MEOS es inducido y la CYP2E1 cataliza la oxidación de etanol a acetaldehído al tiempo que produce especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lieber, 2000).

En esta tesis hemos estudiado tres polimorfismos genéticos presentes en el gen de la enzima CYP2E1. El primero de ellos es el denominado *TaqI* en el gen *CYP2E1* que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio. La frecuencia del alelo variante G en los controles de nuestra población es de 0,12, similar a la frecuencia encontrada en poblaciones caucásicas (Wong y col., 2000). Nuestros resultados parecen sugerir un cierto factor protector frente al cáncer de pulmón asociado al genotipo homocigoto variante G/G, aunque no es una asociación estadísticamente significativa. Además, debido al escaso número de individuos con este genotipo en nuestra población, estos resultados podrían ser un falso positivo. Es más, cuando analizamos la asociación entre los individuos portadores del alelo variante G y el riesgo de cáncer de pulmón, esta posible asociación desaparece, por lo que podemos concluir a la vista del conjunto de nuestros resultados que el polimorfismo *TaqI* no parece tener un efecto sobre el riesgo de cáncer de pulmón en nuestra población de estudio. Este polimorfismo no está ampliamente descrito en la literatura y no ha sido establecida la

posible implicación funcional que este polimorfismo puede ejercer sobre la expresión del gen *CYP2E1* y sobre la actividad de la enzima que codifica este gen. En cuanto al cáncer de pulmón, en un estudio llevado a cabo en una población sueca, no encontraron ninguna diferencia estadísticamente significativa en la distribución del alelo variante G del polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1* entre los casos de cáncer de pulmón y los controles (Persson y col., 1993). En un estudio realizado en una población otomí (indios mejicanos) observaron una mayor frecuencia del alelo variante G del polimorfismo *TaqI* en individuos alcohólicos. Por ello, en este estudio concluyen que este polimorfismo podría desempeñar un papel importante en la susceptibilidad al alcoholismo entre los otomíes, de modo que lo asocian con un mayor riesgo de dependencia del alcohol en esta población. Sin embargo este hallazgo es diferente al que habían descrito previamente en una población blanca (Wong y col., 2000) y en una población de americanos mejicanos (Konishi y col., 2003). En el estudio llevado a cabo por Wong y col., observaron que el alelo variante G estaba asociado con un menor riesgo de desarrollar enfermedad hepática alcohólica, lo que atribuyeron a una posible vinculación del alelo variante G con algún factor protector aún no identificado. Sin embargo no pudieron establecer ninguna asociación entre el polimorfismo *TaqI* en el gen *CYP2E1* y la susceptibilidad de carcinoma hepatocelular (Wong y col., 2000).

El siguiente polimorfismo analizado en el gen *CYP2E1* es el polimorfismo *RsaI*, que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio. La frecuencia del alelo variante c2 en los controles de nuestra población es de 0,04, la cual es coherente con la frecuencia encontrada para el alelo c2 en poblaciones caucásicas (Garte y col., 2001). En nuestros resultados no encontramos una clara asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer de pulmón. En un meta-análisis que incluye 23 estudios con un total de 4.727 casos de cáncer de pulmón y 6220 controles, encontraron un menor riesgo de cáncer de pulmón asociado al genotipo homocigoto variante c2/c2 y a los portadores del alelo variante c2 (Pooled OR = 0,73; IC 95% = 0,62-0,84; Pooled OR = 0,84; IC 95% = 0,77-0,92, respectivamente) en comparación con el genotipo homocigoto salvaje c1/c1. Cuando estratificaban por origen étnico, observaban los mismos riesgos significativos en asiáticos y en poblaciones mixtas, tanto para portadores del alelo c2 como para los homocigotos c2/c2. Sin embargo, no encontraron ninguna asociación significativa en poblaciones caucásicas, lo cual concuerda con nuestros resultados (Shen y col., 2015). En otro meta-análisis también encontraron un menor riesgo de cáncer de pulmón asociado al polimorfismo *RsaI* en el análisis global (OR = 0,80; IC 95 % = 0,71-

0,90). Sin embargo cuando estratifican por etnia, sólo encuentran un efecto protector del polimorfismo *Rsal* frente al riesgo de cáncer de pulmón en asiáticos (OR = 0,81; IC 95 % = 0,71-0,93) (Ye y col., 2015). Estos resultados sugieren que el polimorfismo *Rsal* del gen *CYP2E1* puede ser importante en pacientes con cáncer de pulmón de etnias específicas y el efecto del alelo c2 puede diferir, según la etnia, en el riesgo de cáncer de pulmón. La *CYP2E1* está implicada en la activación metabólica de solventes de bajo peso molecular y procarcinógenos incluyendo nitrosaminas en el tabaco, benceno e hidrocarburos halogenados. La expresión en estudios “in vitro” indica que el alelo variante c2 del polimorfismo *Rsal* en el gen *CYP2E1* está asociado con una mayor actividad transcripcional (Sato y col., 1994) y aumenta el nivel de actividad enzimática *CYP2E1* “in vitro” (Hayashi y col., 1991; Liu y col., 2009).

En un meta-análisis de 21 estudios caso-control en cáncer de cabeza y cuello, el genotipo homocigoto variante c2/c2 está asociado con un aumento del riesgo de cáncer de cabeza y cuello (OR = 1,96; IC 95% = 1,33-2,90). Cuando estratificaban de acuerdo con el origen étnico, la OR aumentaba en los asiáticos con genotipo c2/c2 (OR = 2,04; IC 95% = 1,32-3,15), lo que sugiere que el riesgo es más pronunciado en asiáticos (Tang y col., 2010). El alelo variante c2 también ha sido asociado con un aumento del riesgo de cáncer gastrointestinal en un estudio llevado a cabo en una población de Malasia (Chong y col., 2014). Sin embargo, el alelo variante c2 ha sido asociado con un menor riesgo de cáncer esofágico y cáncer de hígado (Leng y col., 2012; Tian y col., 2012).

Cuando analizamos el efecto del polimorfismo *Rsal* en el gen *CYP2E1* junto con el consumo de alcohol, observamos que el alelo variante c2 aumenta el riesgo de cáncer de pulmón en todas las categorías de consumo de alcohol, excepto en no bebedores. Sin embargo, no hay aumento del riesgo en individuos con genotipo homocigoto salvaje c1/c1 en ninguna de las categorías de consumo de alcohol. Una explicación plausible para estos resultados es que la enzima *CYP2E1* es inducible por alcohol y, dado que el alelo variante c2 está asociado con una mayor actividad transcripcional que conduce a un aumento de los niveles de la enzima *CYP2E1* y a una mayor actividad enzimática, daría lugar a un aumento de la activación metabólica de procarcinógenos, además de un aumento del metabolismo de alcohol a acetaldehído con la producción de especies reactivas de oxígeno que dicho metabolismo conlleva. Todo ello daría lugar a una mayor exposición a compuestos cancerígenos y acumulación de daños en el ADN, lo que conllevaría un aumento del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Esta teoría podría

apoyarse además en un estudio en el que establecían la relación entre genotipo y fenotipo de este polimorfismo en el tejido pulmonar de una población caucásica, dónde observaron que la actividad enzimática media de la CYP2E1 era menor en individuos con genotipo c1/c1 que en individuos con genotipo c1/c2. Aunque este resultado no es estadísticamente significativo, es consistente con la posibilidad de que el alelo variante c2 está asociado con una mayor actividad pulmonar CYP2E1 que el alelo c1 (Yang y col., 2002). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Minegishi y col., estudio en el que observaron que individuos con un consumo elevado de alcohol con el alelo c2 tenían un mayor riesgo de cáncer de pulmón (OR = 2,56; IC 95% = 1,16-5,65) en comparación con individuos con genotipo c1/c1. Este efecto era más evidente en hombres, tanto poco bebedores como grandes bebedores, con el alelo c2 (OR = 8,31, IC 95% = 2,67-25,9; OR = 9,93; IC 95% = 3,39-29,1, respectivamente) cuando eran comparados con individuos con genotipo homocigoto salvaje c1/c1 (Minegishi y col., 2007).

Bouchardy y col. mostraron que en poblaciones blancas, los riesgos más altos de cáncer de cavidad oral o cáncer de faringe se registraron para los grandes bebedores, con un aumento significativo del riesgo de 7,2 veces para los portadores del alelo c2 de la CYP2E1 y un aumento significativo del riesgo de 2,5 veces para aquellos con genotipo c1/c1 en comparación con bebedores moderados con genotipo c1/c1 (Bouchardy y col., 2000). Un aumento significativo del riesgo de cáncer de esófago de 37 veces y 18,6 veces se han observado para los asiáticos con un consumo excesivo de alcohol con genotipo c1/c1 o los genotipos c1/c2 y c2/c2, respectivamente, en comparación con los no bebedores (Yang y col., 2005). Los datos disponibles para los cánceres de nasofaringe, laringe, hígado y mama no sugieren un efecto significativo de los genotipos de la CYP2E1 y el consumo de alcohol (Hildesheim y col., 1997; Bouchardy y col., 2000; Choi y col., 2003; Munaka y col., 2003). Un estudio para el riesgo de cáncer colorrectal mostró un aumento del riesgo en 1,86 veces y en 5,42 veces en bebedores con genotipos c1/c1 o c1/c2 y con genotipo c2/c2, respectivamente, en comparación con no bebedores portadores del alelo c1 (Gao y col., 2007).

El análisis estratificado de nuestros datos muestra que el alelo variante c2 disminuye el riesgo de cáncer de pulmón en el grupo de individuos menores de 55 años, en los individuos con tipo histológico epidermoide, así como en individuos con un consumo de frutas <115,89 g/día. Estos resultados podrían sugerir que este polimorfismo

podría tener un efecto limitado, restringido a determinados tipos histológicos, edades o hábitos de consumo en la dieta. Un reciente meta-análisis concluye que este polimorfismo podría estar asociado con el riesgo de adenocarcinoma (OR = 0.84, IC 95% = 0,71-1,00) (Ye y col., 2015). Minegishi y col. (Minegishi y col., 2007) encontraron que el genotipo c2/c2 era más común en pacientes con adenocarcinomas y carcinoma microcítico. Sin embargo, el genotipo c2/c2 no estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg en los controles de su población de estudio, por lo que estos hallazgos de una asociación con el tipo histológico de cáncer de pulmón son, muy probablemente, falsos positivos. Por otro lado, otros dos estudios de cáncer de pulmón, no encontraron ninguna asociación entre este polimorfismo y los diferentes tipos histológicos (Watanabe y col., 1995; Marchand y col., 1998).

En el caso del polimorfismo *Dral* en el gen *CYP2E1* tampoco encontramos ninguna asociación con el riesgo del cáncer de pulmón. Este polimorfismo se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio y la frecuencia del alelo variante C es de 0,10, consistente con la frecuencia observada en caucásicos (Hu y col., 1997). El alelo variante C se cree que da lugar a un aumento de la transcripción del gen de la *CYP2E1* (Uematsu y col., 1994) y se piensa que puede estar asociado con un aumento de la expresión y actividad de la enzima (Parsian y col., 1998). No obstante, los mecanismos por los que este polimorfismo puede influir en la expresión de *CYP2E1* y en la actividad catalítica de la enzima no están claramente demostrados. De hecho, algunos datos publicados sugieren por el contrario, que este polimorfismo no influye en la expresión de *CYP2E1* y en su actividad catalítica (Chong y col., 2014). Por tanto, los resultados entre este polimorfismo y su posible asociación con el riesgo de cáncer son controvertidos. Así, en un meta-análisis de cáncer de pulmón observaron que los genotipos C/C y C/C + D/C estaban asociados con un menor riesgo de cáncer de pulmón (OR = 0.58; IC 95% = 0,41–0,81 y OR = 0,84; IC 95% = 0,73–0,96, respectivamente)(Wang y col., 2010). Sin embargo, otro meta-análisis en cáncer de pulmón no ha encontrado esta asociación (Ye y col., 2015). Por otro lado, el genotipo homocigoto variante C/C se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer de cabeza y cuello en un meta-análisis basado en 21 estudios caso-control (OR = 1,56; IC 95% = 1,06-2,27) y este aumento del riesgo es más acentuado en asiáticos (OR = 2,04; IC 95% = 1,27-3,29) (Tang y col., 2010). Sin embargo, no se ha establecido una asociación entre este polimorfismo y el riesgo de cáncer gastrointestinal (Chong y col., 2014), ni con el riesgo de cáncer esofágico (Liu y col., 2007).

Cuando analizamos si el alcohol modifica el efecto de este polimorfismo sobre el riesgo de cáncer de pulmón observamos que, tanto un consumo de alcohol de 10-29,9 g/día como ≥ 30 g/día en individuos portadores del alelo variante C parece aumentar el riesgo de cáncer de pulmón. No obstante, no es una asociación estadísticamente significativa. Sin embargo, en el estudio llevado a cabo por Zhang y col (Zhang y col., 2014), cuando llevaban a cabo la estratificación por el consumo de alcohol, no encontraron ninguna asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo *Dral* y el riesgo de cáncer de pulmón.

Nuestros resultados podrían explicarse en base a la posible asociación del alelo variante C del polimorfismo *Dral* con un aumento de la actividad transcripcional del gen *CYP2E1* pero, dado que existe una gran controversia con respecto a la funcionalidad del polimorfismo y su asociación con cáncer, serían necesarios más estudios con el fin de corroborar esta hipótesis.

En el análisis estratificado encontramos que el alelo variante C ejerce un efecto protector frente al desarrollo de cáncer de pulmón en mujeres. Este resultado no se ve apoyado por ningún otro estudio. Además, el tamaño de muestra en este subgrupo es muy pequeño, por lo que serán necesarios más estudios con tamaños de muestra más amplios para poder confirmar estos resultados.

Los resultados del análisis de ligamiento entre los polimorfismos *Rsal*, *Dral* y *TaqI* presentes en el gen *CYP2E1*, muestran que se encuentran en desequilibrio de ligamiento en nuestra población de estudio. El desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos *Rsal* y *Dral* ha sido descrito en otras poblaciones (Konishi y col., 2003) (Persson y col., 1993; Hildesheim y col., 1995; Yu y col., 1995). Sin embargo, Liu R y col., no obtuvieron un desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos *Rsal* y *Dral* en sus resultados (Liu y col., 2007). Por otro lado, en un estudio realizado en hombres mejicanos-americanos, encontraron que el polimorfismo *Dral* estaba en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo *Rsal*, mientras que el polimorfismo *TaqI* no estaba en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo *Rsal* (Konishi y col., 2003).

MTHFR:

El folato es uno de los principales micronutrientes en frutas y verduras y se ha demostrado que la baja ingesta de folato en la dieta es un factor importante en el desarrollo de cáncer (Choi y Mason, 2002; Shen y col., 2003; Shrubsole y col., 2004; Schabath y col., 2005; Larsson y col., 2006). Por otro lado, el consumo de alcohol tiene un impacto negativo en la absorción, utilización y excreción del folato (Herbert and Kshitish, 1994).

La enzima MTHFR tiene un papel muy importante en el metabolismo del folato regulando el flujo de folato entre dos importantes vías: la síntesis y metilación del ADN (Choi y Mason, 2002). Por ello, el estudio de polimorfismos en el gen *MTHFR* que pueden dar lugar a una diferente actividad enzimática es nuestro siguiente punto de interés, dado que podría influir en la susceptibilidad individual en el desarrollo de cáncer de pulmón.

En esta tesis se ha estudiado el polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg en nuestra población de estudio. La frecuencia del alelo variante T en los controles de nuestra población es de 0,35, que está dentro del rango esperado para una población europea (15-55%) (Botto y Yang, 2000; Chango y col., 2000; Keku y col., 2002). No encontramos ninguna asociación entre el consumo de folato y el riesgo de cáncer de pulmón en nuestra población, resultados que concuerdan con un reciente meta-análisis en el que han concluido que el consumo de folato tenía poco o ningún efecto sobre el riesgo de cáncer de pulmón (Zhang y col., 2014). En cuanto al polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, en nuestros resultados observamos un pequeño aumento del riesgo de cáncer de pulmón asociado al alelo variante T. A pesar de la falta de significación estadística, estos resultados son consistentes con nuestra hipótesis. Dos meta-análisis realizados en cáncer de pulmón ratifican nuestros resultados, dado que ambos hallaron un aumento del riesgo de esta enfermedad asociado al genotipo T/T (OR = 1,22; IC 95% = 0,95-1,55 para Boccia y col.; OR = 1,24; IC 95% = 1,04-1,48 en el caso de Zhu y col.) (Boccia y col., 2009; Zhu y col., 2013). Recientemente, en otro meta-análisis de cáncer de pulmón observaron también que el genotipo T/T incrementaba el riesgo de este tipo de neoplasia (OR = 1,67; IC 95% = 1,33–2,10), sin embargo en este caso la asociación queda confinada a poblaciones pertenecientes al norte de China (Liu y col., 2014). También se ha asociado el genotipo T/T con un aumento del riesgo de cáncer de mama (OR = 1.70; IC 95% = 1,06-2,73) (He

y col., 2014), con un aumento del riesgo de cáncer colorrectal (OR = 1,671; IC 95% = 1,094-2,553) (Yin y col., 2012), así como un incremento del riesgo de cáncer de tiroides (OR = 2,06; IC 95% = 1,04-4,10) (Yang y col., 2014). Sin embargo, no se ha encontrado asociación entre el polimorfismo C677T y el riesgo de cáncer de cabeza y cuello (Niu y col., 2015), ni con el adenocarcinoma de esófago (Keld y col., 2014).

La MTHFR es una enzima reguladora clave del metabolismo del folato que convierte el 5,10-metilentetradidrofolato en 5-metiltetrahidrofolato, que es la principal forma de folato en la sangre (Kim, 2007). El alelo variante T está asociado con una menor actividad enzimática ya que individuos con genotipo homocigoto variante T/T tienen aproximadamente un 30% de la actividad enzimática en comparación con el genotipo homocigoto salvaje C/C (Frosst y col., 1995). Esta menor actividad de la enzima MTHFR ha sido asociada con una reducción de los niveles de folato en plasma (Deloughery y col., 1996). Dado que el folato desempeña el papel fundamental de proporcionar grupos metilo para la síntesis de novo de desoxinucleósidos y para las reacciones de metilación intracelulares (Blount y col., 2007), una menor actividad de la enzima MTHFR (asociada al alelo variante T), conduce a un desequilibrio en el flujo del metabolismo del folato que podría llevar a la incorporación errónea de uracilo durante la síntesis de ADN, a daño cromosómico, a roturas en las cadenas de ADN, a una reparación alterada del ADN e hipometilación del ADN. Todo ello daría lugar a un aumento del riesgo de cáncer en general y cáncer de pulmón en particular, como podemos observar en nuestros resultados.

Sin embargo cuando analizamos la asociación del polimorfismo C677T con el riesgo de cáncer de pulmón en función de la ingesta de folato, observamos que un consumo de folato moderado o alto en individuos con genotipo homocigoto variante T/T ejerce un efecto protector en el desarrollo de cáncer de pulmón. Este efecto podría deberse a que un consumo suficiente de folato podría suplir la deficiencia en la actividad enzimática de la MTHFR asociada al genotipo T/T, al haber una mayor cantidad de folato disponible. Por otro lado, el alcohol es un antagonista del folato ya que provoca la escisión del folato de modo que, un consumo elevado de alcohol parece interferir con la utilización del folato y aumenta los requerimientos de folato (Shaw y col., 1989). Por ello, cuando analizamos en conjunto el consumo de alcohol con el polimorfismo C677T y su asociación con cáncer de pulmón, vemos que individuos con genotipo homocigoto variante T/T con un consumo de alcohol ≥ 30 g/día tienen un mayor riesgo de cáncer de

pulmón, lo cual ratifica el efecto que esperábamos encontrar, ya que se suma el efecto antagonista que ejerce el alcohol sobre el folato con la menor actividad de la enzima asociada al genotipo T/T. Sin embargo, observamos un efecto protector cuando el consumo de alcohol en individuos con genotipo T/T es de 10-29,9 g/día. Estos resultados ponen de manifiesto que el polimorfismo C677T del gen *MTHFR* es posiblemente el único polimorfismo génico conocido que pasa de ser un factor de riesgo a un factor protector en función del estado de los nutrientes.

En un meta-análisis de cáncer de pulmón también observaron que el efecto del genotipo homocigoto variante T/T está modificado por la ingesta de folato en la dieta, de forma que individuos con genotipo T/T con un consumo bajo de folato tenían un mayor riesgo de desarrollar esta neoplasia (OR = 1,28; IC 95% = 0,97-1,68), en comparación con individuos con el mismo genotipo pero con un consumo elevado de folato (OR = 0,94; IC 95% = 0,79-1,12). Sin embargo, no encontraron ninguna modificación del efecto cuando estratificaban por el consumo de alcohol (Boccia y col., 2009). Por otro lado, en un estudio caso-control llevado a cabo en una población japonesa, vieron que el mayor riesgo de cáncer de pulmón se asociaba a los individuos con genotipo T/T con un historial de consumo excesivo de alcohol (OR = 3.09, IC 95% = 1,64-5,81) (Kiyohara y col., 2011). Ma y col. (Ma y col., 1997) mostraron que el genotipo T/T manifestó un efecto protector en el riesgo de cáncer colorrectal, pero sólo en los pacientes con una alta ingesta de folato, este mismo resultado fue descrito en una revisión de cáncer colorrectal (Sharp y Little; 2004). Además, en esta revisión también concluyeron que el genotipo T/T parece ser protector solamente en individuos que eran no-bebedores o en bebedores ligeros (Sharp y Little; 2004).

En nuestro análisis estratificado observamos un mayor riesgo de cáncer de pulmón en individuos ≥ 70 años tanto con genotipo heterocigoto C/T, como con genotipo homocigoto variante T/T. El genotipo T/T de la *MTHFR* está vinculado a niveles elevados de homocisteína en plasma (Kim, 1999) y una metilación alterada del ADN (Stern y col., 2000), y se ha demostrado que ambos aumentan con la edad del paciente (Faure-Delanef y col., 1997; Toyota y col., 1999; Ho, 2000). Además, parte de este incremento en el riesgo podríamos atribuirlo al supuesto de que el consumo de folato de los individuos en este rango de edad es de esperar que sea bajo (Shannon y col., 2002), lo cual llevaría a bajos niveles de folato y los efectos perjudiciales que ello conlleva cuando lo asociamos al alelo variante T. Además estos resultados concuerdan con un estudio de

tipo caso-control alemán (Shannon y col., 2002), en el que el genotipo T/T se encontraba con mayor frecuencia en pacientes con cáncer colorrectal en comparación con los controles, especialmente entre los individuos ≥ 70 años.

En cuanto al tipo histológico, individuos heterocigotos C/T tienen un incremento del riesgo de desarrollar carcinoma epidermoide. Por otro lado, observamos un mayor riesgo de adenocarcinoma asociado al genotipo T/T. Nuestros resultados parecen coincidir con los resultados publicados en un meta-análisis por Ning Zhu y col. (Zhu y col., 2013), en el que encontraron que el genotipo T/T estaba asociado a un mayor riesgo de cáncer de pulmón de células no pequeñas (OR = 1,57; IC 95% = 1,05-2,34). Sin embargo no encontraron ninguna asociación con el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico, resultados que son consistentes con los descritos por Hou y col. en otro meta-análisis (Hou y col., 2012).

INTERACCIÓN GEN-GEN:

Por último en cuanto a los análisis de interacción gen-gen que hemos realizado, encontramos una interacción entre el genotipo Arg/Arg (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo Arg370Cys del gen *ADH1B* con los portadores del alelo variante T del polimorfismo C677T del gen *MTHFR* que supone un aumento del riesgo de cáncer de pulmón casi estadísticamente significativo. Por otro lado, existe una interacción entre portadores del alelo variante His (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo Arg48His del gen *ADH1B* y el genotipo c1/c1 (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1*, que da lugar a un menor riesgo de cáncer de pulmón. También encontramos un efecto protector frente al desarrollo de esta neoplasia en la interacción entre portadores del alelo variante His (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo Arg48His del gen *ADH1B* y el genotipo homocigoto salvaje C/C (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*. Otra interacción que supone una disminución del riesgo de cáncer de pulmón es la que observamos entre el genotipo homocigoto salvaje Ile/Ile (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el genotipo homocigoto salvaje D/D (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1*. Finalmente, la interacción entre el genotipo C/C (supuesto alelo de no riesgo) del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* y portadores del alelo variante c2 (supuesto alelo de riesgo) del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1* también es un factor protector frente al cáncer de pulmón.

Un estudio en una población india en carcinoma oral de células escamosas (Solomon y col., 2008), observó que la combinación del genotipo Arg/Arg del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* con el genotipo T/T del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* en pacientes alcohólicos con cáncer daba lugar a un aumento del riesgo (OR = 4,16; IC 95% = 2,78-5,53). Un riesgo similar (OR = 4,16; IC 95% = 1,18-5,53) se demostró para la combinación de los portadores del alelo His del polimorfismo Arg48 His en el gen *ADH1B* con el genotipo T/T del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*. La combinación del genotipo Val/Val del polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* y el genotipo T/T del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* mostraba el máximo riesgo (OR = 20; IC 95% = 13,45-26,64) en el grupo con el consumo de alcohol más elevado. Esta combinación revelaba un alto riesgo en bebedores moderados (OR = 5,88; IC 95% = 4,24-7,50) y un riesgo relativamente menor en los bebedores ligeros (OR = 2,77; IC 95% = 1,74-3,68).

La explicación biológica de nuestros resultados de interacción gen-gen no está muy clara dada la falta de publicaciones que analizan estas interacciones. Serían necesarios nuevos estudios con muestras más amplias para poder aclarar, en primer lugar, el efecto real que tienen algunos de estos polimorfismos, ya que en el caso de los polimorfismos del gen *CYP2E1* estudiados en este trabajo aún no se ha esclarecido su posible efecto en la actividad del gen *CYP2E1* y en segundo lugar, para poder ratificar las interacciones gen-gen que hemos observado en nuestro trabajo.

Podríamos concluir que un consumo bajo-moderado de alcohol podría ejercer un efecto beneficioso frente al cáncer de pulmón. Sin embargo, un consumo elevado aumenta el riesgo de esta neoplasia. No obstante, parte de este efecto dañino podría ser neutralizado con un consumo elevado de frutas y verduras. También observamos un efecto sinérgico entre el alcohol y el tabaco, aumentando el riesgo en 14 veces en individuos que son grandes fumadores y grandes bebedores. Por otro lado, los alelos asociados con una mayor velocidad de oxidación de alcohol a acetaldehído en los polimorfismos Arg48His en el gen *ADH1B* y Ile349Val en el gen *ADH1C*, así como los alelos asociados con una supuesta mayor actividad transcripcional en los polimorfismos *Rsal* y *Dral* en el gen *CYP2E1*, parecen aumentar el riesgo de cáncer de pulmón cuando el consumo de alcohol es elevado. Por otra parte, el alelo variante T del polimorfismo C677T en el gen *MTHFR*, asociado con una menor actividad enzimática, aumenta el riesgo de cáncer de pulmón, riesgo que se mantiene, e incluso aumenta ligeramente, en

individuos con un consumo elevado de alcohol. Sin embargo, cuando el consumo de folato es moderado o alto, el genotipo homocigoto variante T/T del gen *MTHFR* se asocia con un menor riesgo de cáncer de pulmón. También observamos interacciones gen-gen entre los genes *ADH1B* (alelo His48) y *MTHFR* (alelo C677), *ADH1B* (alelo His48) y *CYP2E1* (alelo c1 *RsaI*), *ADH1C* (alelo Ile349) y *CYP2E1* (alelo D *DraI*), y *MTHFR* (alelo C677) y *CYP2E1* (alelo c2 *RsaI*) y todas ellas disminuyen el riesgo de cáncer de pulmón. También observamos interacción entre los genes *ADH1B* (alelo Arg370) y *MTHFR* (alelo 677T) que aumenta el riesgo de esta neoplasia.

Todo ello sugiere que, tanto el consumo de alcohol como polimorfismos en genes que participan en el metabolismo del alcohol y folato, parecen estar implicados en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón.

La principal limitación de este estudio es el pequeño tamaño de muestra, careciendo del poder suficiente para examinar, en algunos casos, el efecto de la estratificación, por lo que sería prudente reproducir nuestros resultados en una muestra de mayor tamaño. Además, debido al diseño caso-control, no podemos excluir la posibilidad de que estos polimorfismos en los genes metabolizadores del alcohol, acetaldehído y folato estén también asociados a alguna de las enfermedades seleccionadas como controles. Este sesgo es conocido como sesgo de Berkson. En este sentido, tenemos que tener en cuenta que el emparejamiento de casos y controles por edad, género y residencia minimiza factores potencialmente confusores, y además, el ajuste adicional de los datos de análisis ayuda a eliminar las insuficiencias en el emparejamiento. Otro posible sesgo que hemos de tener en cuenta es el sesgo de memoria, el cual consiste en un error sistemático debido a las diferencias en el recuerdo de hechos o experiencias previas entre ambos grupos. En este tipo de estudios caso-control puede que los casos recuerden más que los controles algunas experiencias previas. La realización de una entrevista con cuestionario estructurado como la utilizada en nuestro estudio ayuda a minimizar este riesgo. Otra posible limitación es que no podemos excluir la posibilidad de que alguien que ha bebido alcohol previamente, se declare a sí mismo como no bebedor. En cualquier caso, estaríamos subestimando el efecto del alcohol y nuestros resultados no estarían invalidados.

En enfermedades complejas como el cáncer de pulmón, la presencia o ausencia de enfermedad es atribuible a la exposición medioambiental, polimorfismos en múltiples

genes interaccionando, así como a interacciones genes-ambiente. Por lo tanto, el éxito de la investigación requiere la evaluación de variantes génicas funcionales (SNPs) como marcadores de la susceptibilidad al cáncer en estudios epidemiológicos bien diseñados.

El cáncer de pulmón es el paradigma de una enfermedad atribuible a la interacción entre genes y exposición medioambiental. Aunque como ya hemos dicho antes, el tabaco es el mayor factor de riesgo para el cáncer de pulmón, el consumo de alcohol y la susceptibilidad individual desempeñan un papel fundamental en la etiología del cáncer de pulmón. Los acercamientos de la Biología Molecular y la Epidemiología para identificar los factores que contribuyen a aumentar el riesgo en los individuos, así como su posible evolución, constituye un paso importante hacia la prevención del cáncer de pulmón, aunque los resultados obtenidos en este tipo de estudios podrían aportar mecanismos generales implicados no sólo en cáncer de pulmón, sino en otras transformaciones neoplásicas. El tipo de trabajo descriptivo presentado aquí será crítico para decidir qué polimorfismos genéticos se incluyen en futuros estudios sobre valoración de riesgo y modelos estadísticos.

Serían necesarios estudios adicionales de estos polimorfismos y del consumo de alcohol en otras poblaciones para confirmar estos resultados y mayores tamaños de muestra para corroborar las interacciones potencialmente relevantes gen-gen y gen-ambiente. Además, estudios de actividad enzimática y de asociación entre genotipo y fenotipo de los polimorfismos analizados en esta tesis, estudios de metilación del ADN, así como el estudio de otros SNPs presentes en otros genes que participen de algún modo en el metabolismo del alcohol, acetaldehído y folato, ayudaría a entender mejor el papel del alcohol en el cáncer de pulmón. En nuestro caso, la importante colección de muestras biológicas recogidas a lo largo de este trabajo, representa un punto de partida para el análisis de la contribución de los polimorfismos al desarrollo y evolución del cáncer de pulmón.

6. CONCLUSIONES

1. Un consumo de alcohol entre 0,1-9,9 g/día parece ejercer un efecto protector a desarrollar cáncer de pulmón. Sin embargo un consumo de alcohol ≥ 30 g/día podría aumentar el riesgo de cáncer de pulmón.
2. El análisis de la interacción entre el alcohol y el tabaco muestra un claro efecto sinérgico entre ambos con respecto al riesgo de cáncer de pulmón, de modo que una ingesta de alcohol ≥ 30 g/día junto con un consumo de tabaco ≥ 37 paquetes/año aumenta el riesgo de cáncer de pulmón 14 veces.
3. El análisis de interacción entre el consumo de alcohol y verduras respecto al riesgo de cáncer de pulmón muestra que un consumo de verduras ≥ 116.65 g/día disminuye el riesgo de cáncer de pulmón en todas las categorías de consumo de alcohol. La interacción entre el consumo de alcohol y frutas muestra este mismo efecto protector frente al riesgo de cáncer de pulmón en todas las categorías de consumo de alcohol con una ingesta de frutas $\geq 233,13$ g/día. Nuestros resultados sugieren que un elevado consumo de frutas y verduras, debido a sus propiedades beneficiosas, podría neutralizar parte del efecto dañino producido por la ingesta de alcohol.
4. Los polimorfismos Arg48His y Arg370Cys en el gen *ADH1B* parecen disminuir el riesgo de cáncer de pulmón. Sin embargo, con un consumo de alcohol entre 10-29,9 g/día el polimorfismo Arg48His aumenta en tres veces el riesgo de cáncer de pulmón. Estos polimorfismos se encuentran en desequilibrio de ligamiento en nuestra población.
5. El análisis estratificado del polimorfismo Arg48His en el gen *ADH1B* muestra un aumento del riesgo de cáncer de pulmón en individuos menores de 55 años y, por el contrario, una disminución del riesgo en individuos entre 55 y 69 años.
6. El polimorfismo Ile349Val en el gen *ADH1C* no parece influir en el riesgo de cáncer de pulmón. Sin embargo, con un consumo ≥ 30 g/día este polimorfismo parece asociarse con un menor riesgo de cáncer de pulmón.
7. Toda nuestra población de estudio es homocigota salvaje para el polimorfismo Glu504Lys en el gen *ALDH2*.

8. Los polimorfismos *RsaI*, *DraI* y *TaqI* en el gen *CYP2E1* no se asocian con el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en nuestra población. Por otro lado, con un consumo moderado o alto de alcohol los polimorfismos *RsaI* y *DraI* aumentan el riesgo de cáncer de pulmón. Los polimorfismos *RsaI*, *DraI* y *TaqI* se encuentran en desequilibrio de ligamiento en nuestra población.
9. El análisis estratificado del polimorfismo *RsaI* en el gen *CYP2E1* muestra un menor riesgo de cáncer de pulmón en el subgrupo de individuos menores de 55 años, en los individuos con tipo histológico epidermoide, así como en individuos con un consumo de frutas <115,89 g/día.
10. El análisis estratificado del polimorfismo *DraI* en el gen *CYP2E1* muestra una disminución en el riesgo de cáncer de pulmón en mujeres.
11. El polimorfismo C677T en el gen *MTHFR* parece aumentar el riesgo de cáncer de pulmón y este riesgo es aún más elevado con un consumo de alcohol ≥ 30 g/día. Sin embargo, este polimorfismo se asocia con una disminución del riesgo de cáncer de pulmón cuando el consumo de alcohol es de 10-29,9 g/día o con una ingesta moderada o alta de folato.
12. En el análisis estratificado del polimorfismo C677T se observa que los subgrupos en los que se encuentra un mayor aumento del riesgo a desarrollar cáncer de pulmón son los individuos de mayor edad (≥ 70 años), pacientes con adenocarcinoma y pacientes con carcinoma epidermoide.
13. En el análisis de interacción gen-gen encontramos una interacción entre el gen *ADH1B* (alelo Arg370) y el gen *MTHFR* (alelo 677T) que parece aumentar el riesgo de cáncer de pulmón. Por otro lado, observamos interacciones entre los genes *ADH1B* (alelo 48His) y *MTHFR* (alelo C677), *ADH1B* (alelo 48His) y *CYP2E1* (alelo c1 *RsaI*), *ADH1C* (alelo Ile349) y *CYP2E1* (alelo D *DraI*), y *MTHFR* (alelo C677) y *CYP2E1* (alelo c2 *RsaI*), y todas ellas parecen disminuir el riesgo de cáncer de pulmón.
14. Tanto el alcohol como polimorfismos en genes que participan en el metabolismo del alcohol y folato parecen estar implicados en la susceptibilidad individual a desarrollar cáncer de pulmón.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agarwal DP, (2001). "Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes". *Pathol Biol (Paris)*. 49(9):703-9. Review.

Agúndez J, Ladero J, Díaz-Rubio M y col., (1996). "Rsa I polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus is not related to the risk of alcohol-related severe liver disease". *Liver*. 16(6):380-3.

Albano E, Clot P, Morimoto M y col., (1996). "Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol". *Hepatology*. 23(1): 155-63.

Allen NE, Beral V, Casabonne D y col., (2009). "Moderate alcohol intake and cancer incidence in women". *J Natl Cancer Inst*. 101:296-305.

Baan R, Straif K, Grosse Y y col., (2007). "Carcinogenicity of alcoholic beverages". WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. *Lancet Oncol*. (4):292-3.

Bagnardi V, Randi G, Lubin J y col., (2010). "Alcohol consumption and lung cancer risk in the Environment and Genetics in Lung Cancer Etiology (EAGLE) study". *Am J Epidemiol*. 171(1):36-44.

Bagnardi V, Rota M, Botteri E y col., (2015). "Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis". *Br J Cancer*. 112(3):580-93.

Bailey LB, (2003). "Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C-->T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations". *J Nutr*. 133(11 Suppl 1):3748S-3753S.

Balbo S, Meng L, Bliss RL y col., (2012). "Kinetics of DNA adduct formation in the oral cavity after drinking alcohol". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 21(4):601-8.

Ball DM, Sherman D, Gibb R y col., (1995). "No association between the c2 allele at the cytochrome P450IIE1 gene and alcohol induced liver disease, alcohol Korsakoff's syndrome or alcohol dependence syndrome". *Drug Alcohol Depend*. 39(3):181-4.

Bandera EV, Freudenheim JL, Vena JE, (2001). "Alcohol consumption and lung cancer: a review of the epidemiologic evidence". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10(8):813-21. Review.

Baron O, Amini M, Duveau D y col., (1996). "Surgical resection of pulmonary metastases from colorectal carcinoma. Five-year survival and main prognostic factors". *Eur J Cardiothorac Surg.* 10(5):347-51.

Baylin SB, Makos M, Wu JJ y col., (1991). "Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression". *Cancer Cells.* 3: 383-390.

Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA y col., (2004). "A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis". *Am J Hum Genet.* 75(2): 330-7.

Bianchini F, Jaeckel A, Vineis P y col., (2001). "Inverse correlation between alcohol consumption and lymphocyte levels of 8-hydroxydeoxyguanosine in humans". *Carcinogenesis.* 22:885-90.

Bianchini F y Vainio H, (2003). "Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention?" *Eur J Cancer Prev.* 12:417-25.

Blount BC, Mack MM, Wehr CM y col., (1997). "Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(7):3290-5.

Boccia S, Boffetta P, Brennan P y col., (2009). "Meta-analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and risk of head and neck and lung cancer". *Cancer Lett.* 273(1):55-61.

Boffetta P. (2002). "Involuntary smoking and lung cancer." *Scand J Work Environ Health.* 28 Suppl 2:30-40.

Boffetta P, Hashibe M, (2006). "Alcohol and cancer". *Lancet Oncol.* 7(2):149-56. Review.

Boffetta P, Hashibe M, La Vecchia C y col., (2006). "The burden of cancer attributable to alcohol drinking". *J. Int J Cancer.* 119(4):884-7.

Bond GL, Hu W, Bond EE y col., (2004). "A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans". *Cell.* 119(5):591-602.

Borràs E, Coutelle C, Rosell A y col., (2000). "Genetic polymorphism of alcohol dehydrogenase in Europeans: the ADH2*2 allele decreases the risk of alcoholism and is associated with ADH3*1". *Hepatology.* 31:984–989.

Bosron WF y Li TK, (1986). "Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism". *Hepatology.* 6(3):502-10.

Bosron WF y Li TK, (1987). "Catalytic properties of human liver alcohol dehydrogenase isoenzymes". *Enzyme.* 37:19–28.

Bottini N, Musumeci L, Alonso A y col., (2004). "A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes". *Nat Genet.* 36(4): 337-8.

Botto LD, Yang Q, (2000). "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review". *Am J Epidemiol.* 151(9):862-77. Review.

Bouchardy C, Hirvonen A, Coutelle C y col., (2000). "Role of alcohol dehydrogenase 3 and cytochrome P-4502E1 genotypes in susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract". *Int J Cancer* 87(5):734-40.

Brennan P, Lewis S, Hashibe M y col., (2004). "Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review". *Am J Epidemiol.* 159(1):1-16.

Brooks PJ y Theruvathu JA, (2005). "DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis". *Alcohol*. 35(3):187-93.

Brooks PJ, Theruvathu JA, (2006). "Acetaldehyde-DNA adducts: implications for the molecular mechanism of alcohol related carcinogenesis". In: Cho CH, Purohit V (eds) *Alcohol, tobacco and cancer*. Karger, Basel, pp 78-96.

Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R y col., (2001). "High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry". *PNAS*. 98:581-4.

Cao Y, Willett WC, Rimm EB y col., (2015). "Light to moderate intake of alcohol, drinking patterns, and risk of cancer: results from two prospective US cohort studies". *BMJ*. 351:h4238

Carrière V, Berthou F, Baird S y col., (1996). "Human cytochrome p4502E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype". *Pharmacogenetics*. 6:203–11.

Chang JS, Straif K, Guha N, (2012). "The role of alcohol dehydrogenase genes in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis of ADH1B and ADH1C". *Mutagenesis*. 27(3):275-86.

Chango A, Potier De Courcy G, Boisson F y col., (2000). "5,10-methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants (SU.VI.MAX) cohort". *Br J Nutr*. 84(6):891-6.

Chen CC, Lu RB, Chen YC y col., (1999). "Interaction between the functional polymorphisms of the alcohol metabolism genes in protection against alcoholism". *Am J Hum Genet*. 65:795–807.

Choi JY, Abel J, Neuhaus T y col., (2003). "Role of alcohol and genetic polymorphisms of CYP2E1 and ALDH2 in breast cancer development". *Pharmacogenetics*. 13(2):67-72.

Choi SW, Kim YI, Weitzel JN y col., (1998). "Folate depletion impairs DNA excision repair in the colon of the rat". *Gut*. 43: 93-99.

Choi SW, Mason JB, (2002). "Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis". *J Nutr*. 132(8 Suppl):2413S-2418S. Review.

Chong ET, Lee CC, Chua KH y col., (2014). "RsaI but not DraI polymorphism in CYP2E1 gene increases the risk of gastrointestinal cancer in Malaysians: a case-control study". *BMJ Open*. 4(1):e004109.

Coutelle C, Ward PJ, Fleury B y col., (1997). "Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms". *Hum Genet*. 99(3):319-25.

Crabb DW, Edenberg HJ, Bosron WF y col., (1989). "Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant". *J Clin Invest*. 83(1):314-6.

Cueto A, Tardón A y Delgado M, (2001). "Epidemiología del cáncer". Piedrola Gil: *Medicina Preventiva y Salud Pública*, 10ª edición, capítulo 58: 689-702. ISBN: 84-458-1024-3. Madrid.

Database of Genomic Variants. <http://projects.tcag.ca/variation/>

Dellarco VL, (1988). "A mutagenicity assessment of acetaldehyde". *Mutat Res* 195(1): 1-20.

Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A y col., (1996). "Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease". *Circulation*. 94(12):3074-8.

De Menezes RF, Bergmann A, Thuler LC, (2013). "Alcohol consumption and risk of cancer: a systematic literature review". *Asian Pac J Cancer Prev*. 14(9):4965-72.

Dilger K, Metzler J, Bode JC y col., (1997). "CYP2E1 activity in patients with alcoholic liver disease". *J Hepatol.* 27:1009–1014.

Divisi D, Di Tommaso S, Salvemini S y col., (2006). "Diet and cancer". *Acta Biomed.* 77 (2):118-123.

Donaldson MS, (2004). "Nutrition and cancer: a review of the evidence for an anti-cancer diet". *Nutr J* 3: 19.

Dorgan JF, Reichman ME, Judd JT, (1994). "The relation of reported alcohol ingestion to plasma levels of estrogens and androgens in premenopausal women (Maryland, United States)". *Cancer Causes Control.* 5(1):53-60.

Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, y col., (2009). "Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer". *Lancet Oncol.* 10(2):173-80.

Edenberg HJ, (2000). "Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 64:295-341.

Edenberg HJ, Brown CJ, Hur MW y col., (1997). "Regulation of the seven human alcohol dehydrogenase genes". *Adv Exp Med Biol.* 414:339-345.

Edenberg HJ, Xuei X, Chen HJ y col., (2006). "Association of alcohol dehydrogenase genes with alcohol dependence: A comprehensive analysis". *Hum Mol Genet.* 15(9):1539-49.

Ehlers CL, Gilder DA, Harris L y col., (2001). "Association of the ADH2*3 allele with a negative family history of alcoholism in African American Young adults". *Alcohol Clin Exp Res.* 25(12):1773-7.

Ehlers CL, Montane-Jaime K, Moore S y col., (2007). "Association of the ADH1B*3 allele with alcohol-related phenotypes in Trinidad". *Alcohol Clin Exp Res.* 31(2):216-20.

El Ghissassi F, Barbin A, Nair J y col., (1995). "Formation of 1,N6-ethenoadenine and 3,N4-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases". *Chem Res Toxicol.* 8(2):278-83.

Eriksson CJ, (2001). "The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000)" *Alcohol Clin Exp Res.* 25(5 Suppl ISBRA):15S-32S.

Espina N, Lima V, Lieber CS y col., (1988). "In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase". *Carcinogenesis.* 9(5):761-6.

Fang JL, Vaca CE, (1995). "Development of a ³²P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA". *Carcinogenesis.* 16(9):2177-85.

Fang JL, Vaca CE, (1997). "Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers". *Carcinogenesis.* 18:627-32.

Faure-Delanef L, Quere I, Chasse J y col., (1997). "Methylenetetrahydrofolate reductase thermolabile variant and human longevity". *Am J Hum Genet.* 60:999-1001.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R. y col, (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012". *Int. J. Cancer:* 136, E359-E386

Feron VJ, Krusze A, Woutersen RA, (1982). "Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine". *Eur J Cancer Clin Oncol.* 18(1):13-31.

Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS y col., (2000). "Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women". *J Natl Cancer Inst.* 92 (22):1812-1823.

Freudenheim JL, Ram M, Nie J y col., (2003). "Lung cancer in humans is not associated with lifetime total alcohol consumption or with genetic variation in alcohol dehydrogenase 3 (ADH3)". *J Nutr* 133. (11):3619-3624.

Freudenheim JL, Ritz J, Smith-Warner SA y col., (2005) "Alcohol consumption and risk of lung cancer: a pooled analysis of cohort studies". *Am J Clin Nutr.* 82(3):657-67.

Friedman G, Goldschmidt N, Friedlander Y y col., (1999). "A common mutation A1298C in human methylenetetrahydrofolate reductase gene: association with plasma total homocysteine and folate concentrations". *J Nutr.* 129(9):1656-61.

Frosst P, Blom HJ, Milos R y col., (1995). "A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase". *Nat Genet.* 10(1):111-3.

Gao CM, Takezaki T, Wu JZ y col., (2007). "CYP2E1 Rsa I polymorphism impacts on risk of colorectal cancer association with smoking and alcohol drinking". *World J Gastroenterol.* 13(43):5725-30.

Gao CM, Takezaki T, Wu JZ y col., (2008). "Polymorphisms of alcohol dehydrogenase 2 and aldehyde dehydrogenase 2 and colorectal cancer risk in Chinese males". *World J Gastroenterol.* 14(32):5078-83.

Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D y col., (2005). "NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses". *Lancet* 366(9486):649-59.

Garte S, Gaspari L y Alexandrie AK, (2001). "Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10:1239-1248.

Gallicchio L, Boyd K, Matanoski G y col., (2008). "Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review". *Am J Clin Nutr.* 88 (2):372-383.

Gebhardt AC, Lucas D, Ménez JF y col., (1997). "Chlormethiazole inhibition of cytochrome P450 2E1 as assessed by chlorzoxazone hydroxylation in humans". *Hepatology.* 26:957-61.

Gilder FJ, Hodgkinson S y Murray RM, (1993). "ADH and ALDH genotype profiles in Caucasians with alcohol-related problems and controls". *Addiction.* 88:383-388.

Ginsburg ES, (1999). "Estrogen, alcohol and breast cancer risk". J Steroid Biochem Mol Biol. 69(1-6):299-306. Review.

Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A, y col., (1995) "Alcohol, low-methionine--low-folate diets, and risk of colon cancer in men". J Natl Cancer Inst. 87(4):265-73.

Girre C, Lucas D, Hispard E y col., (1994). "Assessment of cytochrome P4502E1 induction in alcoholic patients by chlorzoxazone pharmacokinetics". Biochem Pharmacol. 47:1503–1508.

Globocan, 2012.
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx?country=968 globocan 2012

Gonzalez FJ y Gelboin HV, (1994). "Role of human cytochromes P450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins". Drug Metab Rev. 26(1-2):165-83. Review.

Grove J, Brown AS, Daly AK y col., (1998). "The RsaI polymorphism of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasians: effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype". Pharmacogenetics. 8(4):335-42.

Guo H, Zhang G, Mai R, (2012). "Alcohol dehydrogenase-1B Arg47His polymorphism and upper aerodigestive tract cancer risk: a meta-analysis including 24,252 subjects". Alcohol Clin Exp Res. 36(2):272-8.

Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB y col., (1997). "Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers". J Natl Cancer Inst. 89(22):1698-705

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D y col., (2006). "Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract". Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 15(4):696-703

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, (2007). "Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium". *J Natl Cancer Inst.* 16;99(10):777-89.

Hayashi S, Watanabe J y Kawajiri K, (1991). "Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIIE1 gene". *J Biochem.* 110(4):559-65.

He JM, Pu YD, Wu YJ y col., (2014). "Association between dietary intake of folate and MTHFR and MTR genotype with risk of breast cancer". *Genet Mol Res.* 13(4):8925-31.

Hecht SS, (2003). "Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer". *Nat Rev Cancer.* 3(10): 733-44.

Heijmans BT, Boer JM, Suchiman HE y col., (2003). "A common variant of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (1p36) is associated with an increased risk of cancer". *Cancer Res.* 63(6):1249-53.

Hein DW, (2002). "Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis". *Mutat Res.* 506-507: 65-77.

Helander A y Lindahl-Kiessling K, (1991). "Increased frequency of acetaldehyde-induced sister-chromatid exchanges in human lymphocytes treated with an aldehyde dehydrogenase inhibitor". *Mutat Res.* 264(3):103-7.

Henríquez-Sánchez P, Sánchez-Villegas A, Doreste-Alonso J y col., (2009). "Dietary assessment methods for micronutrient intake: a systematic review on vitamins". *Br J Nutr.* 102 Suppl 1:S10-37.

Herbert V, (1987). "Making sense of laboratory tests of folate status: folate requirements to sustain normality". *Am J Hematol.* 26(2):199-207.

Herbert V y Kshitish CD, (1994). "Folic Acid and Vitamin B12". In: Shils ME, Olson JA, Shike M, editors. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Philadelphia: Lea and Febiger, pp. 402-25

Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ y col., (1997). "CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan". *J Natl Cancer Inst.* 89(16):1207-12.

Hildesheim A, Chen CJ, Caporaso NE y col., (1995). "Cytochrome P450E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma: results from a case-control study conducted in Taiwan". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 4(6):607-10.

Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Anttila S y col., (1993). "The human CYP2E1 gene and lung cancer: DraI and RsaI restriction fragment length polymorphisms in a Finnish study population". *Carcinogenesis.* 14(1):85-8.

Ho C-H, (2000). "The influence of age, sex, vitamin B12, folate levels and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic mutations on plasma homocysteine in the Chinese population". *Haematologica.* 85:1051-4.

Homann N, Tillonen J, Salaspuro M, (2000). "Microbially produced acetaldehyde from ethanol may increase the risk of colon cancer via folate deficiency". *Int J Cancer.* 86(2):169-73.

Hou XH, Huang YM y Mi YY, (2012). "Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism and lung cancer: an updated meta-analysis". *Asian Pac J Cancer Prev.* 13:2025-9.

Houlston RS, (1999). "Glutathione S-transferase M1 status and lung cancer risk: a metaanalysis". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8(8):675-82.

Hsu LC, Yoshida A y Mohandas T, (1986). "Chromosomal assignment of the genes for human aldehyde dehydrogenase-1 and aldehyde dehydrogenase-2". *Am J Hum Genet.* 38(5):641-8.

Hu Y, Oscarson M, Johansson I y col., (1997). "Genetic polymorphism of human CYP2E1: characterization of two variant alleles". *Mol Pharmacol.* 51(3):370-6.

Hukkanen J, Hakkola J, Anttila S y col., (1997). "Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes". *Mol Carcinog.* 20(2):224-30.

Hurley TD, Edenberg HJ y Li TK, (2002). "The Pharmacogenomics of alcoholism". In: *Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies.* Weinheim, Germany: Wiley-VCH, pp. 417-41.

IARC, (1986). "Tobacco smoking". IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans Vol. 38. IARC, Lyon, France.

IARC, (1988). "Alcohol Drinking". IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans Vol. 44. IARC, Lyon, France.

IARC, (2004). "Tobacco smoke and involuntary smoking". IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans Vol. 83. IARC, Lyon, France.

IARC, (2010). "Alcohol consumption and ethyl carbamate" Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 96:1-1424.

IARC, (2011). "Tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish". In *International Agency for Research on Cancer Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Vol. 100E, Lyon, France, IARC Press.

IARC, (2012). "Personal habits and indoor combustions". A review of human carcinogens. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 100E:1-575.

Imhof A, Woodward M, Doering A y col., (2004). "Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille)". *Eur Heart J.* 25:2092–100.

Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Yin H y col., (1993). "Ethanol-inducible cytochrome P4502E1: genetic polymorphism, regulation, and possible role in the etiology of alcohol-induced liver disease". *Alcohol*. 10(6):447-52.

Iron A, Groppi A, Fleury B y col., (1992). "Polymorphism of class I alcohol dehydrogenase in French, Vietnamese and Niger populations: genotyping by PCR amplification and RFLP analysis on dried blood spots". *Ann Genet*. 35(3):152-6.

Ishikawa H, Yamamoto H, Tian Y y col., (2003). "Effects of ALDH2 gene polymorphisms and alcohol-drinking behavior on micronuclei frequency in non-smokers". *Mutat Res*. 541(1-2):71-80.

Iwahashi K, Ameno S, Ameno K y col., (1998). "Relationship between alcoholism and CYP2E1 C/D polymorphism". *Neuropsychobiology*. 38(4):218-21.

Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC y col., (1998). "Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women". *J. Nutr*. 128:1204-12.

Jin Y, Xu Y, Xu M y col., (2005). "Increased Risk of Cancer among Relatives of Patients with Lung Cancer in China". *BMC Cancer*. 5(1):146.

Jörnvall H y Höög JO, (1995). "Nomenclature of alcohol dehydrogenases". *Alcohol Alcohol*. 30(2):153-61. Review.

Kang SS, Wong PW, Susmano A y col., (1991). "Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease". *Am J Hum Genet*. 48:536-45.

Kang HG, Chae MH, Park JM y col., (2006). "Polymorphisms in TGF-beta1 gene and the risk of lung cancer". *Lung Cancer*. 52(1):1-7.

Kato S, Shields PG, Caporaso NE y col., (1992). "Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk". *Cancer Res*. 52(23):6712-5.

Kato S, Shields PG, Caporaso NE y col., (1994). "Analysis of cytochrome P450 2E1 genetic polymorphisms in relation to human lung cancer". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 3(6):515-8.

Keku T, Millikan R, Worley K y col., (2002). "5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 11(12):1611-21.

Keld R, Thian M, Hau C y col., (2014). "Polymorphisms of MTHFR and susceptibility to oesophageal adenocarcinoma in a Caucasian United Kingdom population". *World J Gastroenterol.* 20(34):12212-6.

Kharasch ED, Thummel KE, Mhyre J y col., (1993). "Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxazone metabolism: a clinical probe for P450 2E1". *Clin Pharmacol Ther.* 53:643–50.

Kim YI, (1999). "Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications". *J Nutr Biochem.* 10(2):66-88.

Kim DH, (2007). "The interactive effect of methyl-group diet and polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase on the risk of colorectal cancer". *Mutat Res.* 622(1-2):14-8.

Kiyohara C, Horiuchi T, Takayama K y col., (2011). "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and interaction with smoking and alcohol consumption in lung cancer risk: a case-control study in a Japanese population". *BMC Cancer.* 25;11:459.

Klaassen CD y Watkins III JB, (2001). "Efectos tóxicos de metales". McGraw-Hill Interamericana Editores S. A. *Manual de toxicología*, 5ª edición, 659-721. McGraw-Hill, México D. F.

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY y col., (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration". *Science.* 308(5720):385-9.

Klinchid J, Chewaskulyoung B, Saeteng S y col., (2009). "Effect of combined genetic polymorphisms on lung cancer risk in northern Thai women". *Cancer Genet Cytogenet.* 195(2):143-9.

Knecht KT, Bradford BU, Mason RP y col., (1990). "In vivo formation of a free radical metabolite of ethanol". *Mol Pharmacol.* 38(1): 26-30.

Konishi T, Calvillo M, Leng AS y col., (2003). "The ADH3*2 y CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men". *Exp Mol Pathol.* 74(2):183-9.

Konishi T, Smith JL, Lin KM y col., (2003). "Influence of genetic admixture on polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes: analyses of mutations on the CYP2E1, ADH2, ADH3 and ALDH2 genes in a Mexican-American population living in the Los Angeles area". *Alcohol Alcohol.* 38(1):93-4.

Korte JE, Brennan P, Henley SJ y col., (2002). "Dose-specific meta-analysis and sensitivity analysis of the relation between alcohol consumption and lung cancer risk". *Am J Epidemiol.* 155(6):496-506.

Krishna DR y Klotz U, (1994). "Extrahepatic metabolism of drugs in humans". *Clin Pharmacokinet.* 26(2):144-60. Review.

Kukielka E y Cederbaum AI, (1992). "The effect of chronic ethanol consumption on NADH- and NADPH-dependent generation of reactive oxygen intermediates by isolated rat liver nuclei". *Alcohol Alcohol.* 27(3): 233-9.

Laird PW, Jaenisch R, (1996). "The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics". *Annu Rev Genet.* 30:441-64. Review.

Larsson SC, Håkansson N, Giovannucci E, (2006). "Folate intake and pancreatic cancer incidence: a prospective study of Swedish women and men". *J Natl Cancer Inst.* 98(6):407-13.

Lathrop L, Mason J, Selbuh J, y col., (2000). "Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the Methylenetetrahydrofolate reductase genes". *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 9: 849–53.

Latvala J, Parkkila S, Melkko J y col., (2001). "Acetaldehyde adducts in blood and bone marrow of patients with ethanol-induced erythrocyte abnormalities". *Mol Med.* 7(6):401-5.

Lechevrel M, Casson AG, Wolf CR y col., (1999). "Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa". *Carcinogenesis.* 20(2):243-8.

Leclercq I, Desager JP, Horsmans Y, (1998). "Inhibition of chlorzoxazone metabolism, a clinical probe for CYP2E1, by a single ingestion of watercress". *Clin Pharmacol Ther.* 64:144–49.

Lee GY, Jang JS, Lee SY y col., (2005). "XPC polymorphisms and lung cancer risk." *Int J Cancer.* 115(5):807-13.

Le Marchand L, Guo C, Benhamou S y col., (2003). "Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States)". *Cancer Causes Control.* 14(4): 339-46.

Leng WD, Zeng XT, Chen YJ y col., (2012). "Cytochrome P450 2E1 RsaI/PstI polymorphism and risk of esophageal cancer: A meta-analysis of 17 case-control studies". *Exp Ther Med.* 4(5):938-948.

Levi F, (1999). "Cancer prevention: epidemiology and perspectives". *Eur J Cancer.* 35(14):1912-24.

Lewis J, Bird A, (1991). "DNA methylation and chromatin structure". *FEBS Lett.* 285(2):155-9.

Li DP, Dandara C, Walther G y col., (2008). "Genetic polymorphisms of alcohol metabolising enzymes: their role in susceptibility to oesophageal cancer". *Clin Chem Lab Med.* 46(3):323-8.

Li JJ, Benesova M, Goette K y col., (2001). "Enhanced risk of upper alimentary tract cancer in patients with the alcohol dehydrogenase 3*1 allele due to increased salivary acetaldehyde following ethanol ingestion". *Gastroenterology.* 120:A-160.

Li TK, Yin SJ, Crabb DW y col., (2001). "Genetic and environmental influences on alcohol metabolism in humans". *Alcohol Clin Exp Res.* 25(1):136-44.

Lieber CS, (1997). "Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role". *Physiol Rev.* 77(2):517-44. Review.

Lieber CS, (2000). "ALCOHOL: its metabolism and interaction with nutrients". *Annu Rev Nutr.* 20:395-430. Review.

Lieber CS, (2003). "Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease". *Alcohol Res Health.* 27(3):220-31. Review.

Lievers KJ, Boers GH, Verhoef P y col., (2001). "A second common variant in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk". *J Mol Med (Berl).* 79(9):522-8.

Liu NB, Li J, Qi JF y col., (2014). "Methylenetetrahydrofolate Reductase 677TT Genotype may be Associated with an Increased Lung Cancer Risk in North China: An Updated Meta". *Med Sci Monit.* 29;20:2817-23.

Liu R, Yin LH y Pu YP, (2007). "Association of combined CYP2E1 gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell carcinoma in Huai'an population, China". *Chin Med J (Engl).* 120(20):1797-802.

Liu S, Cui Y, Yang B y col., (2015). "Relationship between ADH2 Arg47His variation and hepatocellular carcinoma susceptibility: a meta analysis". *Int J Clin Exp Med*. 8(6):9543-9548.

Liu Y, Meng XW, Zhou LY y col., (2009). "Genetic polymorphism and mRNA levels of cytochrome P450IIE1 and glutathione S-transferase P1 in patients with alcoholic liver disease in different nationalities". *Hepatobiliar y Pancreat Dis Int*. 8(2):162-7.

López-Cima MF, Alvarez-Avellón SM, Pascual T y col., (2012). "Genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 metabolic genes and risk of lung cancer in Asturias". *BMC Cancer*. 27;12:433.

Lucas D, Ménez C, Floch F y col., (1996). "Cytochromes P4502E1 and P4501A1 genotypes and susceptibility to cirrhosis or upper aerodigestive tract cancer in alcoholic Caucasians". *Alcohol Clin Exp Res*. 20(6):1033-7.

Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E y col., (1997). "Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer". *Cancer Res*. 57(6):1098-102.

Manautou JE y Carlson GP, (1991). "Ethanol-induced fatty acid ethyl ester formation in vivo and in vitro in rat lung". *Toxicology*. 70(3): 303-12.

Mannisto S, Smith-Warner SA, Spiegelman D y col., (2004). "Dietary carotenoids and risk of lung cancer in a pooled analysis of seven cohort studies". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 13 (1):40-48.

Marchand LL, Sivaraman L, Pierce L y col., (1998). "Association of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggests cell type specificities to tobacco carcinogens". *Cancer Res*. 68:4858–4863.

Marcus PM, Vineis P y Rothman N, (2000). "NAT2 slow acetylation and bladder cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies conducted in the general population". *Pharmacogenetics*. 10(2):115-22.

Martín-Ruíz A, Rodríguez-Gómez I, Rubio C y col., (2004). "Tobacco toxic effects". *Rev Toxicol.* 21:64-71.

Matsuda T, Terashima I, Matsumoto Y y col., (1999). "Effective utilization of N2-ethyl-2'-deoxyguanosine triphosphate during DNA synthesis catalyzed by mammalian replicative DNA polymerases". *Biochemistry.* 38(3):929-35.

Matsuo K, Wakai K, Hirose K, y col., (2006). "A gene-gene interaction between ALDH2 Glu487Lys and ADH2 His47Arg polymorphisms regarding the risk of colorectal cancer in Japan". *Carcinogenesis.* 27(5):1018-23.

McBride OW, Umeno M, Gelboin HV y col., (1987). "A Taq I polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E)". *Nucleic Acids Res.* 15:10071.

Minegishi Y, Tsukino H, Muto M y col., (2007). "Susceptibility to lung cancer and genetic polymorphisms in the alcohol metabolite-related enzymes alcohol dehydrogenase 3, aldehyde dehydrogenase 2, and cytochrome P450 2E1 in the Japanese population". *Cancer.* 110:353-62

Mohr LC, Rodgers JK y Silvestri GA, (2003). "Glutathione S-transferase M1 polymorphism and the risk of lung cancer". *Anticancer Res* 23(3A):2111-24.

Molina PE, Hoek JB, Nelson S y col., (2003). "Mechanisms of alcohol-induced tissue injury". *Alcohol Clin Exp Res.* 27(3):563-75.

Montano Loza AJ, Ramirez Iglesias MT, Perez Diaz I y col., (2006). "Association of alcohol-metabolizing genes with alcoholism in a Mexican Indian (Otomi) population". *Alcohol.* 39(2):73-9.

Moore LE, Huang WY, Chatterjee N y col., (2005). "GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms and risk of advanced colorectal adenoma". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14(7):1823-7.

Munaka M, Kohshi K, Kawamoto T y col., (2003). "Genetic polymorphisms of tobacco- and alcohol-related metabolizing enzymes and the risk of hepatocellular carcinoma". *J Cancer Res Clin Oncol*. 129(6):355-60.

Muti P, Trevisan M, Micheli A y col., (1998). "Alcohol consumption and total estradiol in premenopausal women". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 7(3):189-93.

Nakajima M, Hattori E, Yamada K y col., (2007). "Association and synergistic interaction between promoter variants of the DRD4 gene in Japanese schizophrenics". *J Hum Genet*. 52(1):86-91.

Nachiappan V, Mufti SI, Chakravarti A y col., (1994). "Lipid peroxidation and ethanol-related tumor promotion in Fischer-344 rats treated with tobacco-specific nitrosamines". *Alcohol Alcohol*. 29(5): 565-74.

Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Stapleton P y col., (2003). "A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer". *Lung Cancer*. 40(3):247-58.

Nebert DW, Ingelman-Sundberg M y Daly AK, (1999). "Genetic epidemiology of environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues". *Drug Metab Rev*. 31(2):467-87. Review.

Neuberger JS y Field RW, (2003). "Occupation and lung cancer in nonsmokers". *Rev Environ Health*. 18(4):251-67.

Neuhouser ML, (2004). "Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human populationstudies". *Nutr Cancer*. 50(1):1-7.

Neuhouser ML, Patterson RE, Thornquist MD y col., (2003). "Fruits and vegetables are associated with lower lung cancer risk only in the placebo arm of the beta-carotene and retinol efficacy trial (CARET)". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 12 (4):350-358.

Niu YM, Deng MH, Chen W y col., (2015). "MTHFR C677T Gene Polymorphism and Head and Neck Cancer Risk: A Meta-Analysis Based on 23 Publications". *Dis Markers*. 681313.

Obe G y Anderson D, (1987). "Genetic effects of ethanol". International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper No. 15/1. *Mutat Res*. 186(3):177-200.

Obe G y Ristow H, (1979). "Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol". *Mutat Res*. 65(4):229-59.

Oeth P, del Mistro G, marnellos G y col., (2009). "Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY)". *Methods Mol Biol*. 578:307-43.

Ohmiya N, Taguchi A, Mabuchi N y col., (2006). "MDM2 promoter polymorphism is associated with both an increased susceptibility to gastric carcinoma and poor prognosis". *J Clin Oncol*. 24(27):4434-40.

Onland-Moret NC, Peeters PH, van der Schouw YT y col., (2005). "Alcohol and endogenous sex steroid levels in postmenopausal women: a cross-sectional study". *J Clin Endocrinol Metab*. 90(3):1414-9.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA y col., (2001). "Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype". *Carcinogenesis*. 22(1):57-61.

O'Shea D, Davis SN, Kim RB y col., (1994). "Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity". *Clin Pharmacol Ther*. 56:359-67.

Osier M, Patstis AJ, Kidd JR y col., (1999). "Linkage disequilibrium at the ADH2 and ADH3 loci and risk of alcoholism". *Am J Hum Genet*. 64:1147-1157.

Palma, Farran, Cantós, (2008). "Tablas de composición de Alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España: CESNID.MADRID". Mc Graw Hill Interamerican.

Panés J, Soler X, Parés A y col., (1989). "Influence of liver disease on hepatic alcohol and aldehyde dehydrogenases". *Gastroenterology*. 97:708–714.

Park SH, Choi JE, Kim EJ y col., (2006). "MDM2 309T>G polymorphism and risk of lung cancer in a Korean population". *Lung Cancer*. 54(1):19-24.

Parle-McDermott A, Mills JL, Molloy AM y col., (2006). "The MTHFR 1298CC and 677TT genotypes have opposite associations with red cell folate levels". *Mol Genet Metab*. 88(3):290-4.

Parsian A, Cloninger CR, Zhang ZH, (1998). "Association studies of polymorphisms of CYP2E1 gene in alcoholics with cirrhosis, antisocial personality, and normal controls". *Alcohol Clin Exp Res*. 22:888–91.

Pasanen M y Pelkonen O, (1994). "The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta". *Crit Rev Toxicol*. 24(3):211-29. Review.

Persson I1, Johansson I, Bergling H y col., (1993). "Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer". *FEBS Lett*. 319(3):207-11.

Peto J, (2001). "Cancer epidemiology in the last century and the next decade". *Nature*. 411(6835):390-5.

Pöschl G, Stickel F, Wang XD y col., (2004). "Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects". *Proc Nutr Soc*. 63(1):65-71.

Pöschl G. y Seitz HK, (2004). "Review Alcohol and cancer". *Alcohol & Alcohol*. 39(3):155-65.

Pottern LM, Morris LE, Blot WJ y col., (1981). "Esophageal cancer among black men in Washington, D.C. I. Alcohol, tobacco, and other risk factors". *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 77-783.

Purohit V, (2000). "Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens?". *Alcohol.* 22(3):123-7. A review.

Quertemont E, (2004). "Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism". *Mol Psychiatry.* 9(6):570-81. Review.

Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK, (2001). "Research advances in ethanol metabolism". *Pathol Biol (Paris).* 49(9):676-82.

Reicks MM, Crankshaw DL, (1996). "Modulation of rat hepatic cytochrome P-450 activity by garlic organosulfur compounds". *Nutr Cancer.* 25:241-48.

Rehm J, y col., (2004). "Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors". In: Ezzati M, Murray C. Lopez AD, Rodgers A (eds) *World Health Organization, Geneva*, pp 959-1108.

Riboli E y Norat T, (2003). "Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk". *Am J Clin Nutr.* 78 (3 Suppl):559S-569S.

Risch A, Ramroth H, Raedts V y col., (2003). "Laryngeal cancer risk in Caucasians is associated with alcohol and tobacco consumption but not modified by genetic polymorphisms in class I alcohol dehydrogenases ADH1B and ADH1C, and glutathione-S-transferases GSTM1 and GSTT1". *Pharmacogenetics.* 13(4):225-30.

Roberts BJ, Shoaf SE y Song BJ, (1995). "Rapid changes in cytochrome P4502E1 (CYP2E1) activity and other P450 isozymes following ethanol withdrawal in rats". *Biochem Pharmacol.* 49 (11):1665-1673.

Roychoudhury AK y Nei M, (1988). "Human Polymorphic Genes: World Distribution". *Oxford University Press, New York.*

Rozen R, (1997). "Genetic predisposition to hyperhomocysteinemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)". *Thromb Haemost.* 78:523-6.

Rohrmann S, Linseisen J, Boshuizen HC y col., (2006). "Ethanol intake and risk of lung cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)". *Am J Epidemiol.* 164(11):1103-14.

Salaspuro M, (1996). "Bacteriocolonic pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications". *Ann Med.* 28(3):195-200. Review.

Saleem MM, Al-Tamer YY, Skursky L y col., (1984). "Alcohol dehydrogenase activity in the human tissues". *Biochem Med.* 31(1):1-9.

Sangrajrang S, Jedpiyawongse A, Srivatanakul P, (2006). "Genetic polymorphisms of CYP2E1 and GSTM1 in a Thai population". *Asian Pac J Cancer Prev.* 7(3):415-9

Sasco AJ, Secretan MB y Straif K, (2004). "Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence". *Lung Cancer.* 45 Suppl 2:S3-9.

Sato S, Nakamura Y y Tsuchiya E, (1994). "Difference of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung". *Cancer Res.* 54:5652-5.

Savolainen VT, Pajarinen J, Perola M y col., (1997). "Polymorphism in the cytochrome P450 2E1 gene and the risk of alcoholic liver disease". *J Hepatol.* 26(1):55-61.

Schabath MB, Spitz MR, Lerner SP y col., (2005). "Case-control analysis of dietary folate and risk of bladder cancer". *Nutr Cancer.* 53(2):144-51.

Schwartz SM., Doody DR, Fitzgibbons ED y col., (2001). "Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10(11):1137-44.

Secretan B, Straif K, Baan R y col., (2009). "A review of human carcinogens--Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish". WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. *Lancet Oncol.* 10(11):1033-4.

Seitz HK, (2000). "Alcohol and retinoid metabolism". *Gut.* 47(6):748-50.

Seitz HK y Becker P, (2007). "Alcohol metabolism and cancer risk." *Alcohol Res Health.* 30(1):38-41,44-7.

Seitz HK, Garro AJ y Lieber CS, (1981). "Enhanced pulmonary and intestinal activation of procarcinogens and mutagens after chronic ethanol consumption in the rat". *Eur J Clin Invest.* 11(1):33-8.

Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A y col., (2001). "Alcohol and cancer". *Alcohol Clin Exp Res.* 25(5 Suppl ISBRA):137S-143S.

Seitz HK, Pöschl G, Simanowski UA, (1998). "Alcohol and cancer". *Recent Dev Alcohol.* 14:67-95.

Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT y col., (1990). "Possible role of acetaldehyde in ethanol related rectal cocarcinogenesis in the rat". *Gastroenterology.* 98:406-13.

Seitz HK y Stickel F, (2007). "Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis." *Nat Rev Cancer.* 7(8):599-612.

Seitz HK y Stickel F, (2010). "Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism". *Genes Nutr.* 5(2):121-8.

Shannon B, Gnanasampanthan S, Beilby J y col., (2002). "A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability". *Gut.* 50(4):520-4.

Sharp L, Little J, (2004). "Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review". *Am J Epidemiol.* 159(5):423-43.

Shaw S, Jayatilleke E, Herbert V y col., (1989). "Cleavage of folates during ethanol metabolism. Role of acetaldehyde/xanthine oxidase-generated superoxide". *Biochem J.* 257(1):277-80.

Shen H, Wei Q, Pillow PC, col., (2003). "Dietary folate intake and lung cancer risk in former smokers: a case-control analysis". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(10):980-6.

Shen ZT, Wu XH, Li B, y col., (2015). "CYP2E1 Rsa I/Pst I polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis involving 10,947 subjects". *J Cell Mol Med.* 19(9):2136-42.

Shrubsole MJ, Gao YT, Cai Q y col., (2004). "MTHFR polymorphisms, dietary folate intake, and breast cancer risk: results from the Shanghai Breast Cancer Study". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 13(2):190-6.

Simonetti P, Brusamolino A, Pellegrini N y col., (1995). "Evaluation of the effect of alcohol consumption on erythrocyte lipids and vitamins in a healthy population". *Alcohol Clin Exp Res.* 19(2):517-22.

Singletony KW y Gapstur SM, (2001). "Alcohol and breast cancer: review of epidemiologic and experimental evidence and potential mechanisms". *JAMA.* 286(17):2143-51.

Smith M, (1986). "Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases". *Adv Hum Genet.* 15:249-90.

Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS y col., (2003). "Fruits, vegetables and lung cancer: a pooled analysis of cohort studies". *Int J Cancer.* 107 (6):1001-1011.

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), (2014). "Las Cifras del Cáncer en España 2014". <http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/104582-el-cancer-en-espana-2014#content>

Solano RS y Jiménez CA, (2002). "Manual de tabaquismo, 2ª edición, 193". Separ. Masson. Barcelona.

Solomon PR, Selvam GS y Shanmugam G, (2008). "Polymorphism in ADH and MTHFR genes in oral squamous cell carcinoma of Indians". Oral Dis. 14 (7):633-9.

Song BJ, (1996). "Ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1): biochemistry, molecular biology and clinical relevance: 1996 update". Alcohol Clin Exp Res. 20(8 Suppl): 138A-146A.

Sorensen M, Autrup H, Tjonneland A y col., (2004). "Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer". Int J Cancer. 110(2):219-24.

Steinmetz KA y Potter JD, (1991a). "Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology". Cancer Causes Control. 2:325-57.

Steinmetz KA y Potter JD, (1991b). "Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms". Cancer Causes Control. 2:427-42.

Stern L, Mason J, Selhub J y col., (2000). "Genomic DNA hypomethylation, a characteristic of most cancers, is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene". Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9:849-53.

Stickel F, Homann N, Benesova M y col., (2003). "Genetic predisposition for alcohol associated upper aerodigestive tract cancer and hepatocellular cancer in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 3*1 allele". Gastroenterology. 124:A547.

Strate LL y Syngal S, (2005). "Hereditary colorectal cancer syndromes". Cancer Causes Control. 16(3):201-13.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY y col., (1993). "Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(17):8098-102.

Sturgis EM, Dahlstrom KR, Guan Y y col., (2001). "Alcohol dehydrogenase 3 genotype is not associated with risk of squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10(3):273-5.

Sun F, Tsuritani I, Yamada Y, (2002). "Contribution of genetic polymorphisms in ethanol-metabolizing enzymes to problem drinking behavior in middle-aged Japanese men". *Behav Genet.* 32(4):229-36.

Taioli E, Gaspari L, Benhamou S y col., (2003). "Polymorphisms in CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and lung cancer below the age of 45 years". *Int J Epidemiol.* 32(1):60-3.

Takezaki T, Hirose K, Inoue M y col., (2001). "Dietary factors and lung cancer risk in Japanese: with special reference to fish consumption and adenocarcinomas". *Br. J. Cancer.* 84:1199-1206.

Tang K, Li Y, Zhang Z y col., (2010). "The PstI/RsaI and DraI polymorphisms of CYP2E1 and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 21 case-control studies". *BMC Cancer.* 22;10:575.

Tardón A, Lee W, Delgado-Rodríguez M y col., (2005). "Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis". *Cancer Causes Control.* 16(4):389-97.

The Single Nucleotide Polymorphism database.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

Theruvathu JA, Jaruga P, Nath RG y col., (2005). "Polyamines stimulate the formation of mutagenic 1, N2-propanodeoxyguanosine adducts from acetaldehyde". *Nucleic Acids Res.* 33(11):3513-20.

Thomasson HR, Beard JD y Li TK, (1995). "ADH2 gene polymorphisms are determinants of alcohol pharmacokinetics". *Alcohol Clin Exp Res.* 19(6):1494-9.

Thomasson HR, Edenberg HJ, Crabb DW y col., (1991). "Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and alcoholism in Chinese men". *Am J Hum Genet.* 48:677–681.

Thurman RG, (1973). "Induction of hepatic microsomal reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent production of hydrogen peroxide by chronic prior treatment with ethanol". *Mol Pharmacol.* 9(5): 670-5.

Tian Z, Li YL, Zhao L y col., (2012). "CYP2E1 RsaI/PstI polymorphism and liver cancer risk among east Asians: a HuGE review and meta-analysis". *Asian Pac J Cancer Prev.* 13(10):4915-21

To i Figueras J, (1999). "Tobacco and cancer: from epidemiological association to molecular evidence". *Med Clin (Barc).* 112(15):589-94.

Toh Y, Oki E, Ohgaki K y col., (2010). "Alcohol drinking, cigarette smoking, and the development of squamous cell carcinoma of the esophagus: molecular mechanisms of carcinogenesis". *Int J Clin Oncol.* 15(2):135-44.

Torre LA, Bray F, Siegel RL y col., (2015). "Global Cancer Statistics, 2012". *CA Cancer J Clin.* 65:87-108.

Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M y col., (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer". *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:8681–6.

Tuyns A, (1978). "Alcohol and Cancer". *Alcohol: Health and Research World* 2, 20-31.

Uehara Y, Kiyohara C, (2010). "Alcohol Consumption and Lung Cancer Risk among Japanese: A Meta-Analysis". *Fukuoka Igaku Zasshi.* 101(5):101-8.

Uematsu F, Kikuchi H, Motomiya M y col., (1991). "Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to lung cancer". *Jpn J Cancer Res.* 82(3):254-6.

Uematsu F, Ikawa S, Kikuchi S y col., (1994). "Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P450IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: Possible relevance to low smoking exposure". *Pharmacogenetics.* 4:58-63.

USDA. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service (2010). USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23. Nutrient Data Laboratory Homepage, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.

Valdes-Ramos R y Benitez-Arciniega AD, (2007). "Nutrition and immunity in cancer". *Br J Nutr.* 98 Suppl 1:S127-132

Van den Boom D, Beaulieu M, Oeth P y col., (2004). "MALDI-TOF MS: a platform technology for genetic discovery". *Int Journ Mass Spectrom.* 238:173-88.

Vidal F, Lorenzo A, Auguet T y col., (2004). "Genetic polymorphisms of ADH2, ADH3, CYP4502E1 Dra-I and Pst-I, and ALDH2 in Spanish men: lack of association with alcoholism and alcoholic liver disease". *Journal of Hepatology.* 41:744-750.

Vidal F, Pérez J, Panisello J y col., (1993). "Atypical liver alcohol dehydrogenase in the Spanish population: its relation with the development of alcoholic liver disease". *Alcohol Clin Exp Res.* 17:782-785.

Viitala K, Makkonen K, Israel Y y col., (2000). "Autoimmune responses against oxidant stress and acetaldehyde-derived epitopes in human alcohol consumers". *Alcohol Clin Exp Res.* 24(7):1103-9.

Villard PH, Seree EM, Re JL y col., (1998). "Effects of tobacco smoke on the gene expression of the Cyp1a, Cyp2b, Cyp2e, and Cyp3a subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA". *Toxicol Appl Pharmacol.* 148(2):195-204.

Viljoen DL, Carr LG, Foroud TM y col., (2001). "Alcohol dehydrogenase-2*2 allele is associated with decreased prevalence of fetal alcohol syndrome in the mixed-ancestry population of the Western Cape Province, South Africa". *Alcohol Clin Exp Res.* 25(12):1719-22.

Vineis P, Marinelli D, Autrup H y col., (2001). "Current smoking, occupation, Nacetyltransferase-2 and bladder cancer: a pooled analysis of genotype-based studies". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10(12):1249-52.

Vineis P, Veglia F, Benhamou S y col. (2003). "CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls". *Int J Cancer.* 104(5):650-7.

Vioque J, Gonzalez L (1991). "Validity of a food frequency questionnaire (preliminary results)". *Eur J Cancer Prev.* 1:19-20.

Vioque J, Weinbrenner T, Asensio L y col., (2007). "Plasma concentrations of carotenoids and vitamin C are better correlated with dietary intake in normal weight than overweight and obese elderly subjects". *Br J Nutr.* 97(5):977-86.

Vioque J, Barber X, Bolumar F y col., (2008). "Esophageal cancer risk by type of alcohol drinking and smoking: a case-control study in Spain". *BMC Cancer.* 8:221.

Voigt MD, (2005). "Alcohol in hepatocellular cancer". *Clin Liver Dis.* 9(1):151-69.

Wang HL, Zhou PY, Liu P y col., (2014). "ALDH2 and ADH1 Genetic Polymorphisms May Contribute to the Risk of Gastric Cancer: A Meta-Analysis". *PLoS ONE.* 9(3):e88779.

Wakai K, Nagata C, Mizoue T y col., (2007). "Alcohol drinking and lung cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population". *Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan.* *Jpn J Clin Oncol.* 37(3):168-74.

Wall TL, Carr LG y Ehlers CL, (2003). "Protective association of genetic variation in alcohol dehydrogenase with alcohol dependence in Native American Mission Indians". *Am J Psychiatry*. 160(1):41-6.

Wang M, Qin S, Zhang T y col., (2015). "The effect of fruit and vegetable intake on the development of lung cancer: a meta-analysis of 32 publications and 20 414 cases". *Eur J Clin Nutr*. doi: 10.1038/ejcn.2015.64.

Wang SL, Lee H, Chen KW, y col., (1999). "Cytochrome P4502E1 genetic polymorphisms and lung cancer in a Taiwanese population". *Lung Cancer*. 26:27-34.

Wang Y, Yang H, Li L y col., (2009). "Association between CYP2E1 genetic polymorphisms and lung cancer risk: A meta-analysis". *Eur J Cancer*. 46(4):758-64.

Watanabe J, Yang JP, Eguchi H y col., (1995). "An Rsa I polymorphism in the CYP2E1 gene does not affect lung cancer risk in a Japanese population". *Jpn J Cancer Res*. 86(3):245-8.

WCRF/AIFC Research, (2007). "Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective". Washington DC: AICR.

Webb A, Lind PA, Kalmijn J y col., (2011). "The investigation into CYP2E1 in relation to the level of response to alcohol through a combination of linkage and association analysis". *Alcohol Clin Exp Res*. 35(1):10-8.

Weir BS y Cockerham CC, (1989). "Complete characterization of disequilibrium at two loci". In: Feldman ME, editor. *Mathematical Evolutionary Theory*. Princeton: Princeton Univ. Press. p.86–110.

White IR, (1999). "The level of alcohol consumption at which all-cause mortality is least". *J Clin Epidemiol*. 52:967–75.

WHO (World Health Organization), (1999). "Global status report on alcohol". Geneva.

Willett W, Sampson L, Stampfer M y col., (1985). "Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire". *Am J Epidemiol.* 122(1):51-65.

Willett W, (1998). "Nutritional Epidemiology (2nd ed.)". New York.

Woodson K, Tangrea JA, Barrett MJ y col., (1999). "Serum alphas-tocopherol and subsequent risk of lung cancer among male smokers". *J Natl Cancer Inst.* 91:1738–43.

Woutersen RA, Appelman LM, Van Garderen-Hoetmer A y col., (1986). "Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study". *Toxicology.* 41(2):213-31.

Wong NA, Rae F, Simpson KJ y col., (2000). "Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis". *Mol Pathol.* 53(2):88-93.

Wu X, Amos CI, Kemp BL y col., (1998). "Cytochrome P450 2E1 Dral polymorphisms in lung cancer in minority populations". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7(1):13-8.

Xu WH, Shrubsole MJ, Xiang YB y col., (2007). "Dietary folate intake, MTHFR genetic polymorphisms, and the risk of endometrial cancer among Chinese women". *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(2):281-7.

Xue Y, Wang M, Zhong D y col., (2012). "ADH1C Ile349Val Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from 35 Case-Control Studies". *PLoS One.* 7(5):e37227.

Yamamoto K, Ueno Y, Mizoi Y y col., (1993). "Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism". *Arukuru Kenkyuto Yakubutu Ison.* 28:3–25.

Yang CS, Smith TJ, Hong JY, (1994). "Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations". *Cancer Res.* 54:1982s–1986s.

Yang CX, Matsuo K, Ito H y col., (2005). "Esophageal cancer risk by ALDH2 and ADH2 polymorphisms and alcohol consumption: exploration of gene-environment and gene-gene interactions". *Asian Pac J Cancer Prev.* 6(3):256-62.

Yang M, Coles BF, DeLongchamp R y col., (2002). "Effects of the ADH3, CYP2E1, and GSTP1 genetic polymorphisms on their expressions in Caucasian lung tissue". *Lung Cancer.* 38(1):15-21.

Yang SJ, Wang HY, Li XQ y col., (2007). "Genetic polymorphisms of ADH2 and ALDH2 association with esophageal cancer risk in southwest China". *World J Gastroenterol.* 13(43):5760-4.

Yang YM, Zhang TT, Yuan L y col., (2014). "The association between the C677T polymorphism in MTHFR gene and the risk of thyroid cancer: a meta-analysis". *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 18(15):2097-101.

Ye XH, Song L, Peng L y col., (2015). "Association between the CYP2E1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis". *Mol Genet Genomics.* 290(2):545-58.

Yin G, Kono S, Toyomura K y col., (2004). "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study". *Cancer Sci.* 95(11):908-13.

Yin G, Ming H, Zheng X y col., (2012). "Methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism and colorectal cancer risk: A case-control study". *Oncol Lett.* 4(2):365-369.

Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T y col., (1998). "Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics". *Carcinogenesis.* 19(8):1383-7.

Yoshida A, Hsu LC y Yasunami M, (1991). "Genetics of human alcohol-metabolizing enzymes". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 40:255-87.

Yoshida R, Shioji I, Kishida A y col., (2001). "Moderate alcohol consumption reduces urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by inducing of uric acid". *Ind Health*. 39:322–9.

Yu MW, Gladek-Yarborough A, Chiamprasert S y col., (1995). "Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma". *Gastroenterology*. 109:1266-1273.

Zhang JW, Yu WJ, Sheng XM y col., (2014). "Association of CYP2E1 and NAT2 Polymorphisms with Lung Cancer Susceptibility among Mongolian and Han Populations in the Inner Mongolian Region". *Asian Pac J Cancer Prev*. 15(21):9203-10.

Zhang L, Jiang Y, Wu Q y col., (2014). "Gene-environment interactions on the risk of esophageal cancer among Asian populations with the G48A polymorphism in the alcohol dehydrogenase-2 gene: a meta-analysis". *Tumour Biol*. 35(5):4705-17.

Zhang YF, Zhou L, Zhang HW y col., (2014). "Association between folate intake and the risk of lung cancer: a dose-response meta-analysis of prospective studies". *PLoS One*. 9(4):e93465.

Zhu N, Gong Y, He J y col., (2013). "Influence of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on the Risk of Lung Cancer and the Clinical Response to Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: An Updated Meta-Analysis". *Yonsei Med J*. 54(6):1384-93.

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

8. ANEXOS

ANEXO I: Listado de diagnósticos para los controles**1. Enfermedades del sistema nervioso y de los órganos de los sentidos**

1.a. Trastornos del ojo y sus anexos (360-379)

366 Catarata

Excluye: catarata congénita (743.3)

2. Enfermedades del sistema circulatorio

2.a. Varices en las extremidades inferiores (ICD- 454)

Excluye: aquellas que complican el embarazo, parto o puerperio (671.8)

454.0 Con úlcera

454.1 Con inflamación

454.2 Con úlcera e inflamación

454.9 Sin mención de úlcera o inflamación

2.b. Hemorroides (ICD- 455)

Excluye aquellas que complican embarazo, parto o puerperio (671.8)

455.1 Hemorroides internas trombosadas

455.2 Hemorroides internas con otra complicación

455.3 Hemorroides externas sin mención de complicación

455.4 Hemorroides trombosadas

455.5 Hemorroides externas trombosadas

455.6 Hemorroides no especificadas sin mención de complicación

455.7 Hemorroides trombosadas no especificadas

455.8 Hemorroides no especificadas con otra complicación

455.9 Colgajos cutáneos hemorroidales residuales

3. Enfermedades del sistema digestivo

3a 1- Enfermedades periodontales y de la encía

523.0 Gingivitis aguda. *Excluye: gingivitis ulceronecrótica aguda (101), gingivoestomatitis herpética (054.2)*

523.2 Retracción gingival

523.3 Perodontitis aguda. *Excluye: absceso periapical (522.5, 522.7). Periodontitis apical aguda (522.4)*

523.5 Perodontosis

523.6 Acreciones en los dientes

523.9 Sin especificar

3.a. Apendicitis (ICD- 540)

540.0 Con peritonitis generalizada

540.1 Con absceso peritoneal

540.9 Sin mención de peritonitis

541 Apendicitis, sin calificar

542 Otra apendicitis (excluye hiperplasia (linfoide) de la apéndice 543.0)

543 Otras enfermedades del apéndice

- 543.0 Hiperplasia del apéndice (linfoide)
- 543.9 Otras enfermedades y enfermedades no clasificadas del apéndice

3.b. Hernias inguinales y otras hernias del abdomen (ICD-9 550-553)

550 Hernia Inguinal

- 550.0 Hernia inguinal, con gangrena
- 550.1 Hernia inguinal, con obstrucción, sin mención de gangrena
- 550.9 Hernia inguinal, sin mención de obstrucción o gangrena

551 Otra hernia de la cavidad abdominal, con gangrena

- 551.0 Hernia femoral con gangrena
 - 551.00 Unilateral o no especificada (no especificada como recurrente)
 - 551.01 Unilateral o no especificada, recurrente
 - 551.02 Bilateral (no especificada como recurrente)
 - 551.03 Bilateral, recurrente
- 551.1 Hernia umbilical con gangrena
- 551.2 Hernia ventral con gangrena
 - 551.20 Ventral no especificada con gangrena
 - 551.21 Con incisión con gangrena
 - 551.29 Otra

551.3 Hernia diafragmática con gangrena

(Excluye aquella con mención de gangrena 551.0-551.9)

552. Otra hernia de la cavidad abdominal, con obstrucción, pero sin mención de gangrena *(Excluye aquella con mención de gangrena)*

- 552.0 Hernia femoral con obstrucción
 - 552.00 Unilateral o no especificada (no especificada como recurrente)
 - 552.01 Unilateral o no especificada, recurrente
 - 552.02 Bilateral (no especificada como recurrente)
 - 552.03 Bilateral, recurrente
- 552.1 Hernia umbilical con obstrucción
- 552.2 Hernia ventral con obstrucción
 - 552.20 Ventral, no especificada, con obstrucción
 - 552.21 Por incisión, con obstrucción
 - 552.29 Otra

552.3 Hernia diafragmática con obstrucción *(Excluye hernia diafragmática congénita)*

552.8 Hernia de otros sitios especificados, con obstrucción

552.9 Hernia de sitio no especificado, con obstrucción

553 Otra hernia de la cavidad abdominal sin mención de obstrucción o de gangrena *(Excluye las enfermedades listadas con mención de gangrena y obstrucción 551.0-551.9)*

553.0 Hernia femoral

- 553.00 Unilateral o no especificada (no especificada como recurrente)
- 553.01 Unilateral o no especificada, recurrente
- 553.02 Bilateral (no especificada como recurrente)
- 553.03 Bilateral, recurrente

553.1 Hernia umbilical

553.2 Hernia ventral

- 553.20 Ventral, no especificada
- 553.21 Por incisión
- 553.29 Otra
- 553.3 Hernia diafragmática (*Excluye: congénita, hernia diafragmática 756.6, hernia hiatal 750.6, esofagocele 530.6*)
- 553.8 Hernia de otros sitios especificados (*Excluye enterocele vaginal 618.6*)
- 553.9 Hernia de sitio no especificado
- 3.c Obstrucción intestinal (ICD-9 560)
- Excluye: duodeno 537.2-537.3, hernia inguinal con obstrucción 550.1, mesentérica: embolia 557.0, infartación 557.0, trombosis 557.0, obstrucción intestinal neonatal 227.01, 777.1-777.2, 777.4; obstrucción intestinal que complica hernia 552.0-552.9.*
- 560.0 Intususcepción *Excluye: intususcepción del apéndice*
- 560.1 Ileo paralítico *Excluye: ileo de calculo biliar 560.31, ileo postoperatorio NEOM 997.4*
- 560.2 Vólvulos
- 560.3 Impacción de intestino
- 560.8 Otra obstrucción intestinal especificada *Excluye: adhesiones sin obstrucción 568.0, estrictura isquémica de intestino*
- 560.9 Obstrucción intestinal no especificada
- 3 c 1.- 562 Divertículo del intestino. *Excluye divertículo (de): congénito del colon (751.5). Meckel (751.0)*
- 562.0 Delgado. Diverticulitis, diverticulosis del: duodeno, yeyuno
- 562.1 Grueso.
- 3.d Otras enfermedades intestinales: prolapso rectal (ICD-569)
- 569 Otros trastornos del intestino
- 569.0 Pólipo anal y rectal *Excluye hemorroides prolapsadas 455.2, 455.5*
- 569.2 Estenosis de recto y ano
- 569.3 Hemorragia de recto y ano *Excluye: hemorragia gastrointestinal NEOM 578.9, melena 578.1*
- 569.4 Otros trastornos especificados de resto y del ano
- 569.41 Ulcera de recto y ano
- 569.42 Dolor anal o rectal
- 569.49 Otros *Excluye: fístula desde el resto hasta: órganos internos, piel 565.1, hemorroides 455.0-455.9, incontinencia del esfinter anal 787.6*
- 569.5 Absceso del intestino *Excluye: absceso apendiceal 540.1*
- 569.6 Funcionamiento defectuoso por colostomía y enterostomía
- 569.8 Otros trastornos especificados del intestino
- 569.9 Trastorno no especificado de intestino
- 3.e Colelitiasis (ICD-574)
- 574.0 Cálculo de la vesícula con colecistitis aguda. Cualquier afección en 574.2 con colecistitis aguda.
- 574.1 Cálculo de la vesícula con otra colecistitis. Colecistitis con colelitiasis SAI. Cualquier afección en 574.2 con colecistitis (crónica)

- 574.2 Cálculo de la vesícula sin mención de colecistitis.
- 574.3 Cálculo de conducto biliar con colecistitis aguda. Cualquier afección en 574.5 con colecistitis aguda.
- 574.4 Cálculo de conducto biliar con otra colecistitis. Cualquier afección en 574.5 con colecistitis (crónica)
- 574.5 Cálculo de conducto biliar sin mención de colecistitis.

4. Enfermedades de la piel y tejidos subcutáneos

ICD-9: 680-709, *excepto 692, 693, 694, 696, 707*

Excluye: enfermedad de Bowens ICD-9 232 e Hiperqueratosis ICD-9 102.3, 103.1, 478.5, 622.1, 624.0, 701.1, 702, 757.1, 757.3

680 Carbúnculo y furúnculo

- 680.0 Cara Excluye: aparato lagrimal 375.31, órbita 376.01, párpado 373.13
- 680.1 Cuello
- 680.2 Tronco *Excluye: nalgas 680.5, órganos genitales externos: femeninos 616.4, masculinos 607.2, 608.4*
- 680.3 Brazo superior y antebrazo
- 680.4 Mano
- 680.5 Nalga
- 680.6 Pierna, salvo pie
- 680.7 Pie
- 680.8 Otros sitios especificados
- 680.9 Sitio no especificado

681 Celulitis y absceso de los dedos de la mano y del pie

- 681.0 Dedo de la mano
- 681.1 Dedo de pie
- 681.9 Celulitis y absceso de dígito no especificado
- 682 Otra celulitis y absceso Excluye: linfangitis (crónica) (subaguda) 457.2
- 682.0 Cara
- 682.1 Cuello
- 682.2 Tronco
- 682.3 Brazo superior y antebrazo
- 682.4 Mano, salvo dedos y pulgar
- 682.5 Nalga *Excluye región anal y rectal 566*
- 682.6 Pierna, salvo pie
- 682.7 Pie, salvo dedos
- 682.8 Otros sitios especificados *Excluye cara 682.0*
- 682.9 Sitio no especificado *Excluye: linfangitis NEOM 457.2*

683 Linfadermitis aguda *Excluye: glándulas dilatadas NEOM 785.6, linfadermitis: crónica o subaguda, salvo mesentérica 289.1, mesentérica (aguda) (crónica) (subaguda) 289.2 no especificada 289.3*

684 Impétigo Excluye: impétigo herpetiforme 694.3

685 Quiste pilonidal

- 685.0 Con absceso
- 685.1 Sin mención de absceso

686 Otras enfermedades locales de la piel y de los tejidos subcutáneos

- 686.0 Pioderma
- 686.1 Granuloma piogénico *Excluye: granuloma piogénico de mucosa oral 528.9*
- 686.8 otras infecciones locales especificadas de la piel y de los tejidos subcutáneos *Excluye: dermatitis infecciosa eczematode 690, paniculitis 729.30-729.39*
- 686.9 Infección local no especificada de la piel y de los tejidos subcutáneos *Excluye: fistula que llega hasta la piel desde órganos internos*
- 690 Dermatitis eritematoscamosa *Excluye: dermatitis eczematosa del párpado 373.31, paraqueratosis variegata 696.2, psoriasis 696.0-696.1, queratosis seboréica 702*
- 691 Dermatitis atópica y estados relacionados
 - 691.0 Eritema de los pañales
 - 691.8 Otra dermatitis atópica y estados relacionados
 - 695 Estados eritematosos
 - 695.0 Eritema tóxico
 - 695.1 Eritema multiforme
 - 695.2 Eritema nudoso *Excluye eritema nudoso tuberculoso 017.1*
 - 695.3 Rosácea
 - 695.4 Lupus eritematoso *Excluye: lupus eritematoso (diseminado) sistémico 710.0, lupus (vulgar) NEOM 017.0*
 - 695.8 Otros estados eritematosos especificados
- 697 Liquen *Excluye: escleroso y atrófico 701.0, escrofuloso 017.0, espinuloso (congénito) 757.39, obtuso córneo 698.3, pilaris (congénito) 757.39, rojo acuminado 696.4, simple crónico 698.3, urticatus 698.2*
 - 697.0 Liquen plano
 - 697.1 Liquen líquido
 - 697.8 Otro liquen, no clasificado bajo otro concepto
 - 697.9 Liquen, sin especificar
- 698 Prurito y estados relacionados *Excluye: prurito especificado como psicógeno 306.3*
 - 698 0 Prurito anal
 - 698.1 Prurito de órganos genitales
 - 698.2 Prúrigo *Excluye prúrigo nodular 698.3*
 - 698.3 Liquenificación y liquen simple crónico *Excluye: neurodermatitis, difusa de Brocq 691.8*
 - 698.9 Trastornos pruríticos no especificados
- 700 Callos y callosidades
- 701 Otras enfermedades hipertróficas y atróficas de la piel *Excluye: dermatomiositis 710.3, edema hereditario de piernas 757.0, esclerodermia (generalizada) 710.1*
 - 701.0 Esclerodermia circunscrita
 - 701.2 Acantosis nigricans adquirida
 - 701.3 Estrías atróficas
 - 701.4 Cicatriz queloide
 - 701.5 Otro tejido de granulación anormal
 - 701.8 Otras enfermedades hipertróficas y atróficas de la piel especificadas
 - 701.9 Enfermedades hipertróficas y atróficas de la piel no especificadas
- 703 Enfermedades de las uñas *Excluye: anomalías congénitas 757.5, oniquia y paroniquia 681.02, 681.11*
 - 703.0 Uña encarnada *Excluye: infección, uña NEOM 681.9*

- 703.8 Otras enfermedades especificadas de la uña
- 703.9 Enfermedad no especificada de uña
- 704 Enfermedades del pelo y folículo piloso *Excluye anomalías congénitas 757.4*
 - 704.0 Alopecia *Excluye: alopecia sifilítica 091.82, madrosis 374.55*
 - 704.1 Hirsutismo *Excluye: hipertrichosis de párpados 374.54*
 - 704.2 Anomalías del pelo *Excluye: triquiasis de párpado 374.05*
 - 704.3 Variaciones de color de pelo
 - 704.8 Otras enfermedades del pelo y de los folículos pilosos
 - 704.9 Enfermedad no especificada del pelo y de los folículos pilosos
- 705 Trastornos de las glándulas sudoríparas
 - 705.0 Anhidrosis
 - 705.1 Miliaria papilosa
 - 705.8 Otros trastornos especificados de las glándulas sudoríparas
 - 705.9 Trastorno no especificado de glándulas sudoríparas
- 706 Enfermedades de glándulas sebáceas
 - 706.0 Acné varioliforme
 - 706.1 Otras acnés *Excluye: acné rosácea 695.3*
 - 706.2 Quiste sebáceo
 - 706.3 Seborrea *Excluye: queratosis seborreica 702, seborrea: de la cabeza 704.8, seca 690*
 - 706.8 Otras enfermedades especificadas de glándulas sebáceas
 - 706.9 Enfermedad no especificada de glándulas sebáceas
- 708 Urticaria *Excluye: anemioedema hereditario 277.6, edema: angioneurótico 995.1, de Quincke 995.1; urticaria: gigante 995.1, papulosa de Hebra 698.2, pigmentosa (juvenil) (congénita) 757.33*
 - 708.0 Urticaria alérgica
 - 708.1 Urticaria idiopática
 - 708.2 Urticaria debida al frío o al calor
 - 708.3 Urticaria dermatográfica
 - 708.4 Urticaria vibratoria
 - 708.5 Urticaria colinérgica
 - 708.8 Otra urticaria especificada
 - 708.9 Urticaria sin especificar
- 709 Otros trastornos de la piel y de los tejidos subcutáneos
 - 709.0 Discromía *Excluye: albinismo 270.2, aquella del párpado 374.52-374.53, nevo pigmentario 216.0-216.9*
 - 709.1 Trastornos vasculares de la piel
 - 709.2 Estados cicatrizales y fibrosis de la piel
 - 709.3 Trastornos degenerativos de la piel
 - 709.4 Granuloma de cuerpo extraño de la piel y tejidos subcutáneos *Excluye: aquel de músculo 728.82*
 - 709.8 Otros trastornos especificados de la piel
 - 709.9 Trastorno no especificado de la piel y tejidos subcutáneos
- 735 Deformidades adquiridas de los dedos del pie. *Excluye: anomalía congénita (754.6, 755.6)*
 - 735.0 Hallux valgus (adquirido)
 - 735.1 Hallux varus (adquirido)
 - 735.2 Hallux rigidus

- 735.3 Hallux malleus
- 735.4 Otro dedo del pie en martillo (adquirido)
- 735.5 Dedo del pie en garra (adquirida)
- 735.8 Otras
- 735.9 Sin especificación

5. Lesiones

5.a Fracturas (ICD-9 800-829), incluyendo prótesis debidas a fracturas.

- 800 Fracturas de bóveda de cráneo
- 801 Fractura de base de cráneo
- 802 Fractura de huesos faciales
- 803 Otras fracturas craneales no calificadas
- 804 Fracturas múltiples que implican al cráneo o a la cara junto con otros huesos
- 805 Fractura de columna vertebral sin mención de lesión del cordón espinal
- 806 Fractura de columna vertebral con lesión medular
- 807 Fracturas de costilla(s), esternón, laringe y tráquea
- 808 Fractura de pelvis
- 809 Fracturas mal definidas de huesos del tronco *Excluye: fracturas múltiples de cráneo o cara con otros huesos (804.0-804.9), costillas exclusivamente (807.0-807.1, 807.4), costillas o esternón con huesos de miembros (819.0-819.1, 828.0-828.1), huesos pélvicos exclusivamente (808.0-808.9)*
- 810 Fractura de clavícula
- 811 Fractura de escápula
- 812 Fractura de húmero
- 813 Fractura de radio y cúbito
- 814 Fractura de hueso(s) carpiano(s)
- 815 Fractura de hueso(s) metacarpiano(s)
- 816 Fractura de una o más falanges de la mano
- 817 Fracturas múltiples de huesos de la mano
- 818 Fracturas mal definidas de miembro superior
- 819 Fracturas múltiples que implican a ambos miembros superiores y miembro superior con costilla(s) y esternón
- 820 Fractura del cuello de fémur
- 821 Fractura de otras partes y de parte no especificadas del fémur
- 822 Fractura de rótula
- 823 Fractura de tibia y peroné
- 824 Fractura de tobillo
- 825 Fractura de uno o más huesos tarsianos y metatarsianos
- 826 Fractura de una o más falanges del pie
- 827 Otras fracturas, fracturas múltiples y fracturas mal definidas de miembro inferior
- 828 Fracturas múltiples con implicación de ambos miembros inferiores, miembro inferior con miembro superior y miembro(s) inferior(es) con costilla(s) y esternón
- 829 Fractura de huesos no especificados

5b. Dislocaciones (ICD-9 830-839)

- 830 Luxación de mandíbula
- 831 Luxación de hombro Excluye: articulación esternoclavicular (839.61, 839.71), esternón (839.61, 839.71)
- 832 Luxación de codo
- 833 Luxación de muñeca
- 834 Luxación de dedo
- 835 Luxación de cadera
- 836 Luxación de rodilla Excluye: antiguo desgarro de cartílago o menisco de la rodilla, antigua o patológica, recurrente, lesiones internas de la articulación de la rodilla
- 837 Luxación de tobillo
- 838 Luxación de pie
- 839 Otras luxaciones, luxaciones múltiples y luxaciones mal definidas

5c Torceduras (ICD-9 840-848)

Excluye: laceración de tendón en heridas abiertas

- 840 Esguinces y torceduras de hombro y brazo superior
- 841 Esguinces y torceduras de codo y antebrazo
- 842 Esguinces y torceduras de muñeca y mano
- 843 Esguinces y torceduras de cadera y muslo
- 844 Esguinces y torceduras de rodilla y pierna
- 845 Esguinces y torceduras de tobillo y pie
- 846 Esguinces y torceduras de la región sacroiliaca
- 847 Esguinces y torceduras de otras partes no especificadas de la espalda
- 848 Otros esguinces y torceduras y esguinces y torceduras mal definidos

5c 1 850 Contusión. Conmoción cerebral

5d Lesiones internas de tórax, abdomen y pelvis (ICD-9 860-869)

- 860 Neumotórax y hemotórax traumáticos
- 861 Lesión de corazón y pulmón
- 862 Lesión de otros órganos intratorácicos y órganos intratorácicos no especificados Excluye: lesión de vasos sanguíneos de tórax (901.0-901.9)
- 863 Lesión del tubo gastrointestinal Excluye: desgarro del esfínter del ano durante el parto (664.2), vesícula biliar (869.0-868.1 con quinto dígito 2), vía biliar (868.0-868.1 con quinto dígito 2)
- 864 Traumatismo del hígado
- 865 Traumatismo del bazo
- 866 Traumatismo del riñón
- 867 Traumatismo de órganos pélvicos Excluye: lesión durante el parto (664.0-665.9)
- 868 Lesión de otros órganos intraabdominales
- 869 Lesión interna de órganos no especificados o de órganos mal definidos

5e Heridas en las extremidades superiores e inferiores (ICD-9 880-897)

- 880 Heridas de hombro y brazo

- 881 Heridas del codo, antebrazo o muñeca
- 882 Herida de mano salvo dedo(s) de la mano exclusivamente
- 883 Herida de dedo(s) de la mano
- 884 Herida múltiple y herida no especificada de miembro superior
- 885 Amputación traumática de dedo pulgar (completa) (parcial)
- 886 Amputación traumática de otro(s) dedo(s) de la mano (completa) (parcial)
- 887 Amputación traumática de brazo y mano (completa) (parcial)
- 890 Herida de cadera y muslo
- 891 Herida de rodilla, pierna (salvo muslo) y tobillo Excluye con múltiples sitio de miembro inferior, aquella de muslo
- 892 Herida de pie salvo dedo(s) de pie exclusivamente
- 893 Herida de dedo(s) del pie
- 894 Herida múltiple y herida no especificada del miembro inferior
- 895 Amputación traumática de dedo(s) de pie (completa) (parcial)
- 896 Amputación traumática de pie (completa) (parcial)
- 897 Amputación traumática de pierna(s) (completa) (parcial)

5e-bis Otras lesiones (IDC-9 900-959.9, excepto 905-909)

- 900 Arteria carótida
 - 900.1 Vena yugular interna
 - 900.8 Otros
 - 900.9 Sin especificación
- 901.0 Aorta Torácica
 - 901.1 Tronco Braquiocefálico y arteria subclavias
 - 901.2 Vena Cava Superior
 - 901.3 Vena Subclavias y tronco Braquiocefálico venoso
 - 901.4 Vaso sanguíneo pulmonar
 - 901.8 Otros
 - 901.9 Sin especificación
- 902.0 Aorta abdominal
 - 902.1 Vena Cava Inferior, (venas hepáticas)
 - 902.2 Tronco Celiaco y arterias Mesentéricas
 - 902.3 Porta y Esplénica
 - 902.4 Vasos Sanguíneos renales
 - 902.5 Vasos sanguíneos Iliacos
 - 902.8 Otros, múltiples vasos sanguíneos del abdomen y de la pelvis
 - 902.9 Sin especificación
- 903.0 Vasos Sanguíneos axilares
 - 903.1 Vasos sanguíneos braquiales
 - 903.2 Vasos Sanguíneos radiales
 - 903.3 Vasos Sanguíneos Cubitales
 - 903.4 Arteria Palmar
 - 903.5 Vasos sanguíneos Digitales
 - 903.8 Otros, múltiples vasos sanguíneos del miembro superior
 - 903.9 Sin especificación

- 904.0 Arteria femoral
- 904.1 Arteria femoral superficial
- 904.2 Venas femorales
- 904.3 Venas safenas
- 904.4 Vasos sanguíneos poplíteos
- 904.5 Vasos sanguíneos tibiales
- 904.6 Vasos sanguíneos plantares profundos
- 904.7 Otros vasos sanguíneos del miembro inferior
- 904.8 Vasos sanguíneos de miembro inferior, sin especificación
- 904.9 sitio no especificado. Traumatismo de vaso sanguíneo SAI

5e-bis.1 Traumatismo Superficial (910-919)

Excluye: Contusión (920-924)

Cuerpo extraño:

- Dejado inadvertidamente en herida operatoria (998.4)
- Residual en tejido blando (728.6)
- Granuloma debido a cuerpo extraño (728.8)
- Herida con cuerpo extraño incidental (870-897)
- Picadura de insectos venenosos (989.5)
- Quemadura (ampollas) (940-949)

Las siguientes subdivisiones de cuarto dígito se usan con las categorías 910-917 y 919:

- .0 Abrasión o quemadura por fricción, sin mención de infección
 - .1 Abrasión o quemadura por fricción, infectada
 - .2 Ampolla, sin mención de infección
 - .3 Ampolla, infectada
 - .4 Picadura de insecto no venenoso, sin mención de infección
 - .5 Picadura de insecto no venenoso, infectada
 - .6 Cuerpo extraño superficial (astilla) sin herida importante ni mención de infección
 - .7 Cuerpo extraño superficial (astilla) sin herida importante, infectada
 - .8 Otro traumatismo superficial y el no especificado, sin mención de infección
 - .9 Otro traumatismo superficial y el no especificado, infectado
- 910 Traumatismo superficial de la cara, del cuello y del cuero cabelludo, excepto el ojo
(Excluye: ojo y anexos (918.-))
- 911 Traumatismo superficial del tronco (Excluye: región escapular (912.-))
- 912 Traumatismo superficial del hombro y del brazo
- 913 Traumatismo superficial del codo, del antebrazo y de la muñeca
- 914 Traumatismo superficial de la mano, excepto el limitado a uno o varios dedos
- 915 Traumatismo superficial de uno o de varios dedos de la mano
- 916 Traumatismo superficial de la cadera, del muslo, de la pierna y del tobillo
- 917 Traumatismo superficial del pie y de los dedos del pie
- 918 Traumatismo superficial del ojo y sus anexos.
Excluye: Cuerpo extraño en la parte externa del ojo (930.-)
- 918.0 Párpados y región periocular
 - 918.1 Córnea
 - 918.2 Conjuntiva

- 918.9 Otro sitio y el no especificado. Globo ocular SAI
- 919 Traumatismo superficial de otros sitios, de sitios multiples.
 - Excluye: Sitios multiples clasificables en la misma categoría de tres digitos (910-918)
- 920 Contusión de la cara, del cuero cabelludo y del cuello, excepto los ojos
- 921 Contusión del ojos y sus anexos
 - 921.0 Equimosis ocular
 - 921.1 Contusión de los parpados y de la región periocular
 - 921.2 Contusion de los tejidos orbitarios
 - 921.3 Contusión del globo ocular
 - 921.9 Contusión del ojo, sin especificación
- 922 Contusión del tronco
 - 922.0 Mama
 - 922.1 Pared anterior del torax
 - 922.2 Pared del abdomen
 - 922.3 Dorso. Excluye: región escapular (923.0)
 - 922.4 Organos genitales
 - 922.8 Sitios multiples del tronco
 - 922.9 Parte no especificada. Tronco SAI
- 923 Contusión del miembro superior
 - 923.0 Hombro y brazo
 - 923.1 Codo y antebrazo
 - 923.2 Muñeca y mano, excepto los dedos solos
 - 923.3 Dedo de la mano
 - 923.8 Sitios multiples del miembro superior
 - 923.9 Parte no especificada del miembro superior. Miembro superior SAI
- 924 Contusión del miembro inferior, de otros sitios y de sitio no especificado
 - 924.0 Cadera y muslo
 - 924.1 Rodilla y pierna
 - 924.2 Tobillo y pie, excepto los dedos
 - 924.3 Dedo del pie
 - 924.4 Sitios multiples del miembro inferior
 - 924.5 Parte no especificada del miembro inferior
 - 924.8 Sitios multiples no clasificados en otra parte
 - 924.9 Sitio no especificado
- Magulladuras (925-929)
 - Excluye: Concusión (850)
 - Magulladura:
 - De organos internos (860-869)
 - Incidental en traumatismo:
 - Interno (860-869)
 - Intracraneal (850-854)
- 925 Magulladura de la cara, del cuero cabelludo y del cuello
 - Excluye: Cabeza (800.3, 803.3)
 - Nariz (802.0, 802.1)
- 926 Magulladura del tronco

Excluye: La de los organos internos (860-869)

926.0 Genitales externos

926.1 Otros especificados

Excluye: Magulladura del torax (862.-)

926.8 Sitios multiples del tronco

926.9 Parte no especificada

927 Magulladura del miembro superior

927.0 Hombro y brazo

927.1 Codo y antebrazo

927.2 Muñeca y mano, excepto los dedos solos

927.3 Dedo de la mano

927.8 Sitios múltiples del miembro superior

927.9 Parte no especificada

5f. Otras enfermedades de origen externo (ICD-9 990-995)

990 Efectos de radiación, sin especificar *Excluye: efectos adversos especificados de la radiación.*

Tales enfermedades deben clasificarse según la naturaleza del efecto adverso, tal como: dermatitis, leucemia, neumonía, quemaduras, quemaduras de sol (el tipo de radiación que da lugar al efecto adverso puede identificarse mediante uso de códigos E)

991 Efectos de la temperatura reducida

992 Efectos de calor y luz *Excluye: enfermedades de glándulas sudoríparas debidas al calor, hiperplexia maligna después de la anestesia, quemaduras, quemaduras de sol*

993 Efectos de la presión atmosférica

994 Efectos de otras causa externas *Excluye: ciertos efectos adversos no clasificados bajo otros conceptos*

995 Ciertos efectos adversos no clasificados bajo otros conceptos *Excluye: complicaciones de cuidados quirúrgicos y médicos*

6. Estados urológicos benignos

6 a Hidrocele (ICD-9 603, excepto 603.1)

603 Hidrocele *Excluye: congénito (778.6)*

603.0 Hidrocele enquistado

603.8 Otros tipos especificados de hidrocele

603.9 Hidrocele, no especificado

6b Varicocele (ICD-9 456.4)

ANEXO II: Consentimiento informado**Hoja de consentimiento****Objetivo del estudio**

Le solicitamos que participe en un estudio destinado a investigar el efecto que los factores genéticos, medioambientales, laborales y alimentarios tienen sobre la salud humana. El estudio se está llevando a cabo en éste y otros hospitales de Asturias estando coordinado por el Área de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Oviedo.

Hemos obtenido su nombre de su médico que es uno de los participantes en el estudio. Su participación en el estudio es voluntaria: puede rechazar participar en él o retirarse en cualquier momento, sin que esto afecte a su atención médica posterior.

Explicación de los procedimientos

Si acepta participar en el estudio su aportación consistirá en responder a las preguntas de un cuestionario y donar muestras de sangre durante su ingreso. Se le pedirá información sobre sus hábitos de vida e historia médica mediante una entrevista personal, de unos 50 minutos de duración. Una enfermera extraerá una muestra de sangre. Le pediremos también que complete un cuestionario sobre su alimentación. En caso de practicarse alguna prueba diagnóstica que permita la toma de muestras biológicas se solicitará parte para el estudio.

Las muestras recogidas serán usadas exclusivamente con fines científicos relacionados con los objetivos del estudio. Con las muestras de sangre realizarán análisis genéticos, bioquímicos e inmunológicos. Todo el material que no sea utilizado inmediatamente será conservado para futuras determinaciones.

Beneficios potenciales

Aunque es poco probable que usted se beneficie directamente de este estudio, su participación es muy importante porque ayudará a aumentar el conocimiento de las causas relacionadas con la salud en nuestra región y a mejorar el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Confidencialidad

La información obtenida en el estudio será **confidencial de acuerdo con lo que marca la ley. Nadie, excepto los miembros del estudio y usted si lo desea, tendrá acceso a la información.**

Consentimiento informado

He leído este documento, he hecho todas las preguntas que creía necesarias y estoy de acuerdo en participar en el estudio de forma global o parcial a alguna de las siguientes partes:

	Si	No
Entrevista	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muestras biológicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acceso al historial médico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nombre y apellidos
del participante.

Firma

D./Dña

Nombre y apellidos
Del Dr./Dra. que solicita el consentimiento

Firma

Dr./Dra.

Fecha: ____ / ____ / ____

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación.

ANEXO III: IDC (Impreso de datos clínicos)

ID PACIENTE

Datos básicos del paciente:

APELLIDOS: _____
 NOMBRE: _____
 DIRECCIÓN: _____
 POBLACIÓN: _____
 TELEFONO: _____
 NºPROTOCOLO: _____
 NºHISTORIA: _____
 FECHA DE NACIMIENTO: ___/___/____ EDAD: _____
 SEXO: 1-HOMBRE 2-MUJER _____ PESO(Kgs): _____ TALLA (cms): _____
 PROFESIÓN: _____

Factores de riesgo:

				CLAVE
1. Antecedentes personales de neoplasia :	0-NO	1-SI	_____
2. Antecedentes familiares de neoplasia:	0-NO	1-SI	_____
3. Tabaco:	0-NO	1-SI	_____
4. Número de paquetes/año:				_____
5. Número de años sin fumar:				_____
6. Otros factores de riesgo:	61	0-NO	1-SI	_____
	62	0-NO	1-SI	_____
	63	0-NO	1-SI	_____
	64	0-NO	1-SI	_____

Datos clínico-patológicos:

7. Presentación clínica al ingreso:	0-NO	1-SI	_____
70 INICIO SÍNTOMAS (DÍAS).....				_____
71 INFECCIÓN RESPIRATORIA	0-NO	1-SI	_____
72 CAMBIOS EN LA TOS	0-NO	1-SI	_____
73 HEMOPTISIS	0-NO	1-SI	_____
74 DISNEA	0-NO	1-SI	_____
75 DOLOR TORACICO	0-NO	1-SI	_____
76 DOLOR HOMBRO/MANO	0-NO	1-SI	_____
77 DISFONIA	0-NO	1-SI	_____
78 FIEBRE	0-NO	1-SI	_____
79 ASTENIA	0-NO	1-SI	_____
710 ANOREXIA	0-NO	1-SI	_____
711 ADELGAZAMIENTO	0-NO	1-SI	_____
712 PESO PERDIDO kgs	_____
713 NAUSEAS,VOMITOS	0-NO	1-SI	_____
714 DISFAGIA	0-NO	1-SI	_____
715 SINDROME CAVA SUPERIOR	0-NO	1-SI	_____
716 SINDROME PARANEOPLÁSICO	0-NO	1-SI	_____
717 SINTOMATOLOGIA METASTASICA	0-NO	1-SI	_____
718 OTROS	0-NO	1-SI	_____
8.Exploración física :	0-NORMAL	1-ANORMAL	_____
81 CABEZA Y CUELLO	0-NORMAL	1-ANORMAL	_____
82 ABDOMEN	0-NORMAL	1-ANORMAL	_____
83 TORAX	0-NORMAL	1-ANORMAL	_____
84 EXTREMIDADES	0-NORMAL	1-ANORMAL	_____
85 OTROS:	0-NORMAL	1-ANORMAL	_____

9.Laboratorio: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA

91 HEMATIES	_____	98 LEUCOCITOS	_____	914 PLAQUETAS	_____
92 NEUTROFILOS	_____	99 HEMOGLOBINA	_____	915 BILIRRUBINA TOTAL	_____
93 TGO	_____	910 TGP	_____	916 GGT	_____
94 LDH	_____	911 FA	_____	917 UREA	_____
95 CREATININA	_____	912 CALCIO	_____	918 MAGNESIO	_____
96 FOSFORO	_____	913 CEA	_____	919 NSE	_____
97 SCC	_____			920 OTROS	_____
				921 COLESTEROL	_____
				922 TRIGLICERIDOS	_____
				923 PROTEINAS	_____
				924 ALBUMINAS	_____

10.Radiología: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA

11. Rx Torax:

111 Descripción de la lesión: _____

112 Localización de la lesión:

1121	LSD	0-NO 1-SI	_____
1122	LM	0-NO 1-SI	_____
1123	LID	0-NO 1-SI	_____
1124	LSI	0-NO 1-SI	_____
1125	LINGULA	0-NO 1-SI	_____
1126	LII	0-NO 1-SI	_____
1127	HILIO DCHO	0-NO 1-SI	_____
1128	HILIO IZDO	0-NO 1-SI	_____

113 Tamaño de la lesión:

1131	Diámetro mayor mm.....	_____
1132	Diámetro perpendicular mm	_____

12. Tac torácico: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA

121 Descripción de la lesión: _____

122 Localización de la lesión:

1221	LSD	0-NO 1-SI	_____
1222	LM	0-NO 1-SI	_____
1223	LID	0-NO 1-SI	_____
1224	LSI	0-NO 1-SI	_____
1225	LII	0-NO 1-SI	_____
1226	LINGULA	0-NO 1-SI	_____
1227	HILIO DCHO	0-NO 1-SI	_____
1228	HILIO IZDO	0-NO 1-SI	_____

123 Tamaño de la lesión:

1231	Diámetro mayor	_____
1232	Diámetro perpendicular mm	_____

13. Tac abdominal : 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA

131 Descripción de la lesión: _____

14. Tac craneal: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA

141 Descripción de la lesión: _____

15. Eco abdomen: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA

151 Descripción de la lesión: _____

16. Gammagrafía ósea: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA _____
 161 Descripción de la lesión: _____

17. ECG: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA _____

18. Gasometria : 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA _____
 181 pH _____ 182 pO2 _____ 183 pCO2 _____

19. Espirometria: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA _____

191 FVC _____ 191b FVC % _____ 192 FEV(1) _____ 192b FEV(1)% _____
 193a FEV1/FVC _____ 193b FEV1/FVC _____

20. Broncoscopia: 0-NORMAL 1-ANORMAL 2- NO PRACTICADA _____
 201 Descripción de la lesión: _____

21. Diagnóstico: 0-NEGATIVA 1-POSITIVA 2-SOSPECHOSA 3-NO PRACTICADO

211 CITOLOGIA ESPUTO _____
 212 CITOLOGIA ASPIRADO _____
 213 CEPILLADO _____
 214 PUNCIÓN PULMONAR _____
 215 CITOLOGIA PLEURAL _____
 216 BIOPSIA BRONQUIAL _____
 217 BIOPSIA TRANSPARIETAL _____
 218 BIOPSIA PLEURAL _____
 219 TORACOTOMIA _____
 220 OTROS _____

21b. Diagnóstico clínico Sí / no _____

22. Tipo histológico:

0-EPIDERMÓIDE 1-ADENOCARCINOMA 2-MICROCÍTICO 3-INDIFERENCIADO 4-CLS GRANDES
 5-OTRO (_____)

23. nº BIOPSIA o INFORME DIAGNOSTICO _____

24. Metástasis: 0-NO 1-SI _____

241 CONTRALATERALES 0-NO 1-SI _____
 242 ADENOPATIA EXTRATORACICA 0-NO 1-SI _____
 243 OSEAS 0-NO 1-SI _____
 244 PLEURALES 0-NO 1-SI _____
 245 CEREBRALES 0-NO 1-SI _____
 246 HEPATICAS 0-NO 1-SI _____
 247 SUPRARRENALES 0-NO 1-SI _____
 248 OTRAS 0-NO 1-SI _____

24. Clasificación TNM en el momento del diagnóstico (marcar con un círculo)

241 T: Tx Tis T1 T2 T3 T4
 242 N: Nx N0 N1 N2 N3
 243 M: Mx M0 M1

25. Estadio en el momento del diagnóstico: (0,IA,IB,IIA,IIB,IIIA,IIIB,IV) _____

26. Grado de actividad OMS : (0,1,2,3,4) _____

Intención terapéutica.

27. Operabilidad 0- NO 1-SI _____

271 Si operabilidad = 0 especificar motivo :

28. Resecabilidad: 0- NO 1-SI _____
 281 Si resecabilidad = 0 especificar motivo :

29. Cirugía:
 291. Realización 0- NO 1-SI _____
 292. Fecha ____/____/____
 293. Intervención realizada _____

 294. Comentarios

30. Quimioterapia:
 301. Realización 0- NO 1-SI _____
 302. Fecha de inicio ____/____/____
 303. Fecha de finalización..... ____/____/____
 304. Nº de ciclos _____
 305. Fármacos:

FARMACOS	DOSIS
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

306. Finalidad : 0-Tratamiento 1- Adyuvante 2-Neoadyuvante _____

31. Radioterapia:
 311. Realización 0- NO 1-SI _____
 312. Fecha de inicio ____/____/____
 313. Fecha de finalización..... ____/____/____
 314. Nº de sesiones _____
 315. Territorio _____
 316. Dosis por sesión _____

32. Tratamiento paliativo 0- NO 1-SI _____

33. Estadio postquirúrgico: (0,IA,IB,IIA,IIB,IIIA,IIIB,IV) _____

Otros datos.

34. Otras patologías presentes que pueden condicionar la evolución: 0 - NO, 1 - Sí

341 EPOC	_____
342 ASBESTOSIS	_____
343 TUB. PREVIA	_____
344 CICATRIZ PREVIA	_____
345 NEUMOCONIOSIS	_____
346 FIBROSIS PULMONAR	_____
347 OTROS	_____
_____	_____
_____	_____

35. Fecha de primer contacto con el hospital _____

36. Fecha de ingreso _____

37. Fecha de alta _____

38. Fecha de cumplimentación del impreso _____

39. Médico responsable :
 Dr. _____

ANEXO IV: Cuestionario de dieta CAPUA

INSTRUCCIONES

- En este cuestionario vamos a preguntarle sobre sus hábitos alimentarios durante los **últimos 5 años.**
- Aunque sus hábitos hayan podido cambiar durante este tiempo, por favor intente recordar, **en término medio,** cada cuando comía cada alimento.
- **No deje preguntas en blanco:**

Si no está seguro, dé una respuesta aproximada.

Si no comía algunos de los alimentos, marque la casilla
“*Nunca o menos de 1 por mes*”

- Para cada alimento, tenga en cuenta tanto cuando lo comía **sólo como combinado o mezclado con otros alimentos** (por ejemplo, huevos en tortilla, pollo en la paella, legumbres y embutidos en potajes, jamón en bocadillos, etc...)
- En su respuesta, incluya alimentos comidos tanto en casa como en el trabajo, en restaurantes, etc...
- Cuando en algún alimento se indique **“en temporada”**, como en el caso de helados y algunas frutas, indique la frecuencia de **consumo durante la temporada.**
- Si es necesario puede pedir la ayuda de un familiar o amigo para contestar el cuestionario. Sin embargo, **usted siempre debe participar en las respuestas.**
- Si aún tiene alguna duda puede llamar al teléfono: **985 10 27 58** y le atenderá *Cristina Arias o Avelino Menéndez.*

EJEMPLO**(NO ESCRIBA EN ESTA PÁGINA)**

Para cada alimento tendrá que marcar con una señal (X) la casilla que más se aproxime a la frecuencia con la que solía comer cada alimento **en la cantidad especificada.**

Por ejemplo:

1. Si usted comía una ración de pollo 1 vez por semana, y nunca comía pato o aves de caza, respondería de la siguiente manera:

AVES Y HUEVOS	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Pollo o pavo (1 pieza o ración)				X				
Pato o aves de caza: faisán, perdiz, codornices, etc... (1 pieza o ración)	X							

2. Si cuando comía pollo, lo comía a la plancha la mitad de las veces, rebozado algunas veces, y en paella algunas veces, respondería de la siguiente manera:

¿Con qué frecuencia comía el pollo o pavo cocinado de las siguientes maneras?	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Siempre
A la plancha o sartén			X		
Frito, rebozado, empanado o enharinado		X			
Guisado, estofado, en paella, en salsa, cocido o hervido		X			
Al horno o al ast	X				
A la brasa o barbacoa, es decir, cocinado en contacto directo con el fuego	X				
Otro (Especificar):	X				

Por favor, marque con una señal (X) la casilla que mas se aproxima a la frecuencia media con la que solía comer cada alimento, **en la cantidad especificada**, durante los **últimos 5 años**.

AVES Y HUEVOS	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Pollo o pavo (1 pieza o ración)								
Pato o aves de caza: faisán, perdiz, codornices, etc... (1 pieza o ración)								
Huevos: fritos, duros, tortilla, etc... (uno)								

¿Con qué frecuencia comía el pollo o pavo cocinado de las siguientes maneras?	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Siempre
A la plancha o sartén					
Frito, rebozado, empanado o enharinado					
Guisado, estofado, en paella, en salsa, cocido o hervido					
Al horno o al ast					
A la brasa o barbacoa, es decir, cocinado en contacto directo con el fuego					
Otro (Especificar):					

¿Cuándo comía pollo cocinado con piel, se comía habitualmente la piel?

(Responda con una señal (X) en la casilla correspondiente).

Sí.....

No.....

¿Cómo tomaba normalmente de hecho el pollo?

(Seleccione de entre las fotografías de platos de pollo que encontrará al final del cuestionario.)

Menos que la foto 1.....

Como la foto 1.....

Entre la foto 1 y la foto 2.....

Como la foto 2.....

Entre la foto 2 y la foto 3.....

Como la foto 3.....

Más que la foto 3.....

TERNERA, BUEY, VACA. 	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Carne de ternera, buey, vaca o res. (1 pieza o ración)								

¿Con qué frecuencia comía la carne cocinada de las siguientes maneras?	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Siempre
A la plancha o sartén					
Frita, rebozada, empanada o enharinada					
Guisada, estofada, en salsa, en potaje, cocida o hervida					
Carne picada: albóndigas, hamburguesas etc...					
Asada o al horno					
A la brasa o barbacoa, es decir, cocinada en contacto directo con el fuego					
Otro (Especificar):					

¿Cómo tomaba normalmente de hecha la carne?

(Seleccione de entre las fotografías de platos de carne de ternera que encontrará al final del cuestionario.)

Menos que la foto 1.....ثف
 Como la foto 1.....ثف
 Entre la foto 1 y la foto 2.....ثف
 Como la foto 2.....ثف
 Entre la foto 2 y la foto 3.....ثف
 Como la foto 3.....ثف
 Más que la foto 3.....ثف

CERDO. 	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Carne de cerdo. (Excluya salchichas, embutidos, bacon, tocino) (1 pieza o ración)								

¿Con qué frecuencia comía el cerdo cocinado de las siguientes maneras?	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Siempre
A la plancha o sartén					
Frito, rebozado, empanado o enharinado					
Guisado, estofado, en salsa, en potaje, cocido o hervido					
Carne picada: albóndigas, hamburguesas, picadillo, etc...					
Asado o al horno					
A la brasa o barbacoa, es decir, cocinado en contacto directo con el fuego					
Otro (Especificar):					

¿Cómo tomaba normalmente de hecho el cerdo?

(Seleccione de entre las fotografías de platos de cerdo que encontrará al final del cuestionario.)

Menos que la foto 1.....ثف

Como la foto 1.....ثف

Entre la foto 1 y la foto 2.....ثف

Como la foto 2.....ثف

Entre la foto 2 y la foto 3.....ثف

Como la foto 3.....ثف

Más que la foto 3.....ثف

CORDERO O CABRA.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Carne de cordero o cabra. (1 pieza o ración)								

¿Con qué frecuencia comía el cordero o cabra cocinado de las siguientes maneras?	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Siempre
A la plancha o sartén					
Frito, rebozado, empanado o enharinado					
Guisado, estofado, en salsa, en potaje, cocido o hervido					
Asado o al horno					
A la brasa o barbacoa, es decir, cocinado en contacto directo con el fuego					
Otro (Especificar):					

OTRAS CARNES Y VISCERAS.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Conejo o liebre. (1 pieza o ración)								
Hígado de ternera, cerdo o pollo. (1 ración)								
Otras vísceras: sesos, mollejas, callos, etc... (1 ración).								
Bacon, tocino o panceta. (2 lonchas)								

Quando comía carne (pollo, ternera, cerdo, cordero, etc...) ¿qué hacía con la grasa visible?

Quitarla toda ٣ف

Quitar la mayor parte ٣ف

Quitarla solo un poco ٣ف

No quitarla ٣ف

En relación a otras personas de su edad y sexo, ¿Cómo eran las raciones de carne (pollo, ternera, cerdo, cordero, etc...) que tomaba normalmente?

Pequeñas ٣ف

Medianas ٣ف

Grandes ٣ف

PESCADO. 	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Pescado blanco: merluza, lenguado, besugo, mero, pescadilla, etc... (1 pieza o ración)								
Pescado azul: sardinas, atún, caballa, bonito, salmón, etc... (1 pieza o ración)								

¿Con qué frecuencia comía el <u>pescado blanco</u> cocinado de las siguientes maneras?	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Siempre
A la plancha o sartén					
Frito, rebozado, empanado o enharinado					
Cocido o hervido					
Paella, caldereta, potaje, zarzuela o en salsa					
Asado o al horno					
A la brasa o barbacoa, es decir, cocinado en contacto directo con el fuego					
Otro (Especificar):					

¿Con qué frecuencia comía el <u>pescado azul</u> cocinado de las siguientes maneras?	Nunca o casi nunca	Algunas veces	Aprox. la mitad de las veces	La mayor parte de las veces	Siempre
A la plancha o sartén					
Frito, rebozado, empanado o enharinado					
En salsa o similar					
Asado o al horno					
A la brasa o barbacoa, es decir, cocinado en contacto directo con el fuego					
Otro (Especificar):					

OTROS PESCADOS Y MARISCOS.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Mejillones, almejas, ostras, llámpares y similares. (6 unidades)								
Pulpo, calamares o sepia. (1 ración)								
Gambas, langostinos y similares. (3-4 unidades)								

En relación a otras personas de su edad y sexo, ¿Cómo eran las raciones de pescado que tomaba normalmente?

Pequeñasقليل

Medianasمتوسط

Grandesكثير

Por favor, intente recordar la **media** de lo que bebía, **en la cantidad especificada**, durante los **últimos 5 años**.

BEBIDAS.	¿Con qué frecuencia bebía los siguientes productos?								
	Nunca o menos de 1 por mes	1-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-3 por día	4 o más por día	
 Vino blanco o rosado (1 vaso o copa)									
Vino tinto (1 vaso o copa)									
Cerveza con alcohol (1 caña, botellín o lata)									
Chanpán, cava (1 copa) o sidra (1 culín)									
Vino dulce, jerez, vermouth, o similar (1 copita o vasito)									
Brandy, coñac, ginebra, ron, whisky, orujo, vodka, aguardiente. (1 copa)									
Licores, anisetes, pacharán. (1 copita)									
Refrescos con cola: coca-cola, pepsi (1 lata, botella pequeña o vaso)									
Otros refrescos con gas: naranja, limón... (1 lata, botella pequeña o vaso)									
Zumo de naranja natural. (1 vaso)									
Zumo o batido de otras frutas naturales: fresa mango, papaya, etc... (1 vaso)									
Zumo de frutas envasado. (1 lata o vaso)									
Zumo de tomate. (1 lata o vaso)									
Horchata, en temporada . (1 vaso)									
Café descafeinado. (1 taza)									
Café (1 taza)									
Té (1 taza)									
Infusiones de hierbas. (1 taza)									

¿Cuántos vasos de agua bebía habitualmente cada día?

(Piense cuantos vasos de agua bebía durante las comidas y entre las comidas)

Ninguno 1/4
 1 vaso 1/4
 2 vasos 1/4
 3-4 vasos 1/4
 5-6 vasos 1/4
 Más de 6 vasos..... 1/4
 No sabe 1/4

VERDURAS Y LEGUMBRES (SOLAS O COMBINADAS).	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	 Nunca o menos de 1 por mes	1-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-3 por día	4 o más por día
Lechuga, endibias, escarola. (1 plato)								
Tomate crudo (uno)								
Gazpacho, en temporada (1 plato soper o taza)								
Cebolla (una)								
Rábanos (3-4 unidades)								
Remolacha (1 plato pequeño)								
Espárragos (3-4 unidades)								
Zanahoria, calabaza. (1 plato pequeño)								
Judías verdes, habichuelas (1 plato)								
Espinacas, acelgas o berros (1 plato)								
Col, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, repollo, berza. (1 plato)								
Berenjenas, pepinos, calabacines, bubangos. (1 plato)								
Pimientos rojos y verdes (uno)								
Champiñones o setas (1 plato pequeño)								
Guisantes (1 plato)								
Alcachofa, en temporada (una)								
Puerros, en temporada (1 plato pequeño)								
Legumbres: lentejas, garbanzos, fabas pintas o blancas, etc... (1 plato)								

FRUTAS Y FRUTOS SECOS.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-3 por día	4 o más por día
								
Naranja, pomelo (una), mandarinas (dos)								
Plátano (uno)								
Manzana o pera (una)								
Uva (1 racimo mediano o plato de postre)								
Kiwi (uno)								
Fresas o fresones, en temporada (1 plato de postre o taza)								
Cerezas o picotas, en temporada (1 plato de postre o taza)								
Melocotón, nectarina (uno), albaricoques o paraguayos (2-3), en temporada								
Higos frescos, en temporada (3-4 unidades)								
Sandía,melón, en temporada (una tajada o porción mediana)								
Mango, papaya, en temporada (uno)								
Aguacate, en temporada. (uno)								
Frutas en almíbar: melocotones, peras, piña, etc... (2 mitades o rodajas)								
Aceitunas (una ración, aprox. 10)								
Frutos secos: almendras, cacahuetes, avellanas, nueces. (1 ración, aprox. 10)								
Frutas desecadas: ciruela, albaricoque, pasas, dátiles, higos. (3-4 unidades)								

PRODUCTOS LÁCTEOS.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-3 por día	4 o más por día
								
Leche desnatada o semidesnatada (sola o con café) (1 vaso o taza)								
Leche entera (sola o con café) (1 vaso o taza)								
Leche condensada (una cuchara de sopa o un barraquito)								
Yogurt descremado (uno)								
Yogurt sin descremar o entero (uno)								
Requesón, mató, cuajada. (una tajada o ración)								
Queso blanco o fresco: de Burgos o cabra. (una tajada o ración)								
Queso cremoso o en porciones (una porción)								
Queso curado o semi curado: manchego, bola, gruyère. (una tajada)								
Queso azul, roquefort, cabrales (una tajada o ración)								
Natillas, flan, puding, crema catalana (una unidad o racion)								
Nata o crema de leche. (media taza)								
Batidos de leche: chocolate, vainilla, etc... (un vaso)								
Helados cremosos, en temporada. (un cucurucho, vasito, bola o corte)								

PRECOCINADOS PREELABORADOS Y OTROS.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-3 por día	4 o más por día
Jamón dulce, york, o cocido (1-2 lonchas)								
Jamón salado: serrano o país. (2-3 lonchas)								
Fuet salchichón o chorizo curado. (4-5 lonchas)								
Otros embutidos: mortadela, salami (4-5 lonchas), sobrasada, (1 loncha)								
Salchichas frescas, morcilla, chistorra (una)								
Frankfurt y similares (uno)								
Pates, foiegras (1 ración)								
Croquetas (3-4 unidades)								
Palitos o delicias de pescado fritas (3-4 unidades)								
Empanadillas o arepas (2-3 unidades)								
Raviolis, canelones, lasaña (1 plato)								
Pescado en salazón: bacalao, anchoas etc... (1 ración)								
Pescado en conserva: sardinas, atún, arenque, etc... (1 lata)								
Sopas y cremas de sobre (1 plato sobero)								
Mayonesa (1 cucharada sobera)								
Salsa de tomate (media taza)								
Picantes: tabasco, pimienta, guindilla, mojo, etc... (media cucharadita)								
Sal (1pizca o pellizco con dos dedos)								
Ajo (1 diente)								

ACEITES Y GRASAS.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-3 por día	4 o más por día
								
Aceite de oliva añadido al pan o comidas (1 cucharada)								
Aceite de girasol, maíz o soja añadido al pan o comidas. (1 cucharada)								
Mantequilla añadida al pan o comidas (1 cucharada o untada)								
Margarina añadida al pan o comidas (1 cucharada o untada)								
Manteca de cerdo añadida al pan o comidas. (1 cucharada o untada)								

¿Con qué clase de aceite o grasa se cocinaban o freían habitualmente sus comidas?
(Si utilizaba más de un tipo, marque todos los que utilizaba)

- Aceite de oliva..... ٠
- Aceite de semillas
(girasol, maíz o soja)..... ٠
- Mezcla de aceite
de oliva y de semillas..... ٠
- Mantequilla ٠
- Margarina ٠
- Manteca..... ٠
- No sabe..... ٠

¿Se solían utilizar los restos de aceite o grasa de sartén para hacer salsa o para cocinar?

- Sí..... ٠
 No..... ٠
 No sabe..... ٠

PAN, CEREALES Y SIMILARES.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2-3 por día	4 o más por día
Pan blanco (1 panecillo o 3 rodajas)								
Pan integral (1 panecillo o 3 rodajas)								
Roscos, rosquilletas, picos, palitos y similares. (3-4 unidades)								
Patatas: cocidas, asadas, puré, patatas arrugadas. (1 plato)								
Bolsa de patatas fritas o “chips” (1 bolsa pequeña)								
Patatas fritas (no “chips”) (1 ración o medio plato)								
Arroz (1 plato)								
Pasta: espagueti, macarrones, etc... (1 plato)								
Pizza o empanada. (1 ración o trozo)								
Gofio (1 plato)								

DULCES Y PASTELES.	¿Con qué frecuencia comía los siguientes alimentos?							
	Nunca o menos de 1 por mes	1 por mes	2-3 por mes	1-2 por semana	3-4 por semana	5-6 por semana	1 por día	2 o más por día
Galletas sin chocolate, tipo María (4-5 galletas)								
Galletas con chocolate (2-3 galletas dobles)								
Croissant, donut, ensaimada, napolitana (uno)								
Magdalena (una), bizcocho (1 trozo)								
Pastel, tarta (1 trozo)								
Churros, porras o masa frita (1 ración, 4-5 unidades)								
Chocolate, bombones (una barrita o 2 bombones)								
Chocolate en polvo (1 cucharada de postre)								
Mermelada, confitura, miel (1 cucharada sopera)								
Azúcar en café, postres o zumos (1 cucharadita)								
Turrón, en temporada (1-2 trozos)								
Mantecados, polvorones, mazapán, panallets, en temporada. (1 unidad)								

SUPLEMENTOS DE VITAMINAS Y MINERALES

Antes de este último año, ¿tomó usted durante más de un mes, pastillas, cápsulas o comprimidos de vitaminas o minerales?

No.....ف (salte a las última pregunta)

Sí.....ف → ¿Qué cantidad y durante cuánto tiempo tomó vitaminas y minerales?

VITAMINAS O MINERALES. 	¿cuántas pastillas?				¿durante cuantos años?				
	Ninguna	1-3 por semana	4-6 por semana	Cada día	Menos de un año	1-2 años	3-4 años	5-9 años	10 o más años
Complejo vitamínico *									
Vitamina C									
Vitamina A									
Complejo vitamínico B									
Hierro									
Calcio									
Otros: (especificar)									

* Tipo: Pharmatón, Multicentrum, Micebrina, Dayamineral, Rochevit, Redoxon complex

Especifique la marca o marcas de suplementos de vitaminas o minerales que tomaba:

ÚLTIMA PREGUNTA

1. ¿Ha hecho alguna vez algún cambio importante en su alimentación por razones de salud o por alguna otra razón?

No.....ف

Sí.....ف → **¿A qué edad hizo este cambio en su alimentación?**

(Escriba la edad en la casilla)

Edad.....ف

¿Durante cuánto tiempo cambió su alimentación?

Menos de 1 año.....ف

1-2 años.....ف

3-4 años.....ف

5-9 años.....ف

10 años o más.....ف

ID: _____

NHC: _____

QUESTIONARIO ALIMENTARIO



ID: _____

NHC: _____

ANEXO V: FFQ (Cuestionario semicuantitativo de frecuencia de alimento)

INFORME EXPLICATIVO SOBRE BASES DE DATOS GENERADAS POR MACROCFA PARA EL ESTUDIO CAPUA

GRUPO EPINUT

BASES DE DATOS GENERADAS MEDIANTE MACRODIETA	
Hojas de Excel	Contenido
Cuestionario	Hoja Excel de recogida de datos del CFA, donde se recoge las frecuencias de consumo para cada alimentos del CFA, desde valor 1 (nunca o menos de 1 vez/mes) hasta 9 (6 veces o más/día)
IngestaGr	Consumo medio diario de alimentos expresados en gramos/día.
IngestaSv	Consumo medio diario de alimentos corregido (por tamaño de porciones) expresados en raciones o serving por día
Nutrientes	Ingesta media diaria de nutrientes expresada en cada unidad natural (cruda, es decir, sin ajustar)
Nutrientes_ajust	Ingesta media diaria de nutrientes ajustadas por ingesta calórica- método residuos (Willett, 1998)*
Grupos_Alím_Gr	Consumo medio diario de grupos de alimentos en gramos por día (ver tabla con grupos de alimentos y alimentos de cada grupo)
Grupos_Alím_Sv	Consumo medio diario de grupos de alimentos en servings o raciones corregidas al día
Grupos_Alím_ajust	Consumo diario de grupos de alimentos en gramos/día ajustados por ingesta calórica –métodos residuos (Willett, 1998).
AHEI	Índice de Calidad Alimentaria: alternate Healthy Eating Index Alternativo (Fung, AJCN, 2005)
aMED	Índice de Calidad Alimentaria: alternate Mediterranean Eating Dietary score (Fung, AJCN, 2005)
OTRAS POSIBLES HOJAS BAJO DEMANADA	Grupos de Alimentos ad hoc Principales alimentos contribuidores del consumo de nutrientes Principales grupos de alimentos contribuidores del consumo de nutrientes

* En el ajuste se añaden los residuos estimados de un modelo de regresión entre calorías (dependiente) y nutriente (independiente) en escala logarítmica, a la ingesta media del nutriente tras recuperar la escala natural. Se usa la distribución de toda la población incluida en el análisis tras modificar y superar algunos problemas técnicos que suponer las transformaciones logarítmicas.

Lista de Alimentos			
Abreviaturas	Gramos por porcion	Serving Corregido	Definición
pollo	90.00	1.00	pollo con piel con sal
pato	100.00	1.00	pato y codorniz
huevos	50.00	1.00	Huevo con sal
ternera	125.00	1.00	Carne de ternera
cerdo	125.00	1.00	Carne de cerdo
cordero	125.00	1.00	Carne de cordero
conejo	100.00	1.00	Conejo
higado	100.00	1.00	Hígado de ternera, cerdo o pollo
visceras	100.00	1.00	Vísceras, callos, sesos, mollejas
bacon	50.00	0.50	Tocino, bacon, panceta
pblanco	100.00	1.00	Pescado blanco
pazul	100.00	1.00	Pescado azul
mejillo	50.00	0.50	Almejas, mejillones y ostras
pulpo	54.00	0.50	Calamar, sepia y pulpo
gamba	50.00	0.50	Gamba, langosta, langostino, camarón y cangrejo
vblanco	125.00	1.00	Vino blanco o rosado
vtinto	125.00	1.00	Vino tinto
cerveza	200.00	1.00	Cerveza
champan	125.00	1.00	Sidra dulce o seca
vdulce	50.00	1.00	Jerez, vinos secos, vermut Brandy, ginebra, ron, whisky, vodka, aguardientes
brandy	40.00	1.00	
licor	30.00	1.00	Licores INMA
coc_peg	250.00	1.00	Refresco de cola
gasnar	250.00	1.00	Refresco de naranja y limón
narnatur	200.00	1.00	Zumo de naranja
fresanat	200.00	1.00	Zumos y batido de frutas natural
zumoenv	200.00	1.00	Zumo frutas envasado
tomate	200.00	1.00	Zumo de tomate
horchata	200.00	1.00	Horchata
cafedesc	200.00	1.00	Café descafeinado
cafe	200.00	1.00	Café
te	200.00	1.00	tea
infusion	200.00	1.00	Otras infusiones
lechuga	60.00	0.60	Lechuga, endibia y escarola
tomates	100.00	1.00	Tomate crudo o triturado
gazpacho	200.00	1.00	gazpacho
cebolla	50.00	1.00	Cebolla cruda o cocinada
rabanos	100.00	1.00	Rabano
remolacha	100.00	1.00	Remolacha
esparra	75.00	0.60	Espárragos
zanaho	100.00	1.00	Zanahoria y calabaza
judias	100.00	1.00	Judías verdes
espinaca	100.00	1.00	Espinacas y acelgas
col	100.00	1.00	Col, coliflor, coles de bruselas y brócoli
berenje	100.00	1.00	Berenjena y calabacín cocinados
pimiento	75.00	1.00	Pimiento rojo o verde
setas	100.00	1.00	Champiñones y setas
guisante	100.00	1.00	Guisantes frescos/congelados cocinados

alcacho	75.00	0.60	Alcachofa
puerro	100.00	1.00	8. puerros EUREYE
legumbre	140.00	1.00	Legumbres, lentejas, garbanzos, judías pintas o blancas
naranja	120.00	1.00	Naranja y mandarina
platano	100.00	1.00	Plátano
manzana	125.00	1.00	Manzana y pera
uva	100.00	1.00	Uva
kiwi	76.00	1.00	Kiwi
fresa ^a	18.75	1.00	Fresas
cereza ^a	18.75	1.00	Cerezas1991-2002
melocot ^a	30.00	1.00	Melocotón, nectarina y albaricoque
higfresc ^a	25.00	1.00	Higos
melon ^a	50.00	1.00	Sandía y melón
Mango ^b	62.50	1.00	Piña, mango y papaya natural
aguacate ^b	50.00	1.00	Aguacate
almibar	100.00	1.00	Frutas en almíbar, melocotón, piña y pera
aceituna	35.00	0.50	Aceitunas
fruseco	30.00	1.00	Frutos secos
frudesec	40.00	1.00	22. fruta seca EUREYE
lechedes	200.00	1.00	Leche desnatada
lecheent	200.00	1.00	Leche entera
lechecon	20.00	1.00	Leche condensada
yogdesc	125.00	1.00	Yogurt desnatado
yogent	125.00	1.00	Yogurt entero mixt
requeson	50.00	1.00	Requesón
quesofre	50.00	0.50	Queso blanco o fresco
quesocre	50.00	0.50	Queso cremoso
quesocur	50.00	1.00	Queso curado o semicurado
quesoazu	50.00	1.00	Queso azul, roquefort, cabrales
natillas	125.00	1.00	Flan y natilla
natalech	7.50	1.00	Nata
batleche	200.00	1.00	Batido de leche
Helados ^c	20.00	1.00	Helado
jamYork	50.00	0.50	Jamón cocido
jamserr	50.00	0.50	Jamón serrano
chorizo	50.00	0.50	Salchicon chorizo
butifarr	50.00	0.50	Mortadela y salami
salchich	25.00	1.00	Longaniza y morcilla
frankfur	25.00	1.00	Salchichas Frankfurt
pates	50.00	1.00	Paté, foie-gras
croqueta	60.00	3.00	Croquetas pollo y jamón
palopesc	60.00	3.00	Palitos de pescado
empanadi	60.00	1.00	Empanadilla
ravioli	140.00	1.00	Ravioli, canelones, lasaña
pesccsalaz	50.00	1.00	Pescado en salazón 1991-1995
pescccons	60.00	1.00	Lata atún, sardina y caballa
sopasobr	250.00	1.00	Sopas con sal
mayonesa	15.00	1.00	Mayonesa
salsatoma	120.00	1.00	Salsa de tomate
picantes	1.50	1.00	Espicias
sal	0.40	1.00	Sal
ajo	3.00	1.00	Ajo
acoliva	10.00	1.00	Aceite de oliva
acgiras	10.00	1.00	Aceites vegetales

mantequi	5.00	0.50	Mantequilla
margari	5.00	0.50	Margarina
manteca	5.00	0.50	manteca de cerdo 1991-1992
panblanc	50.00	1.00	Pan blanco
paninteg	50.00	1.00	Pan integral
roscos	10.00	1.00	Palitos de pan, rosquilletas
patatas	125.00	1.00	Patatas cocidas
chips	30.00	1.00	Bolsa patatas fritas
patfrita	100.00	1.00	Patatas fritas caseras
arroz	165.00	1.00	Arroz cocinado
pasta	140.00	1.00	Pasta, espaghetis y macarrones
pizza	100.00	1.00	Pizza
gofio	100.00	1.00	Gofio
gamaría	20.00	4.00	Galleta María
gachoco	30.00	4.00	Galleta con chocolate
donut	50.00	1.00	Croissant y donuts
bizcocho	50.00	1.00	Magdalena y bizcocho
pastel	75.00	1.00	Pastel 1991-1992 nuevo
churros	60.00	1.00	churros 1991-1992
bombon	30.00	1.00	Chocolate y bombones
chopolvo	15.00	1.00	Chocolate en polvo
mermela	15.00	1.00	Mermelada y miel
azucar	5.00	1.00	Azúcar
turrón ^d	5.00	1.00	Turrón
mantecad ^d	3.33	1.00	Mantecado, polvoron, mazaoan, panallets

^a Para considerar la temporalidad se ha dividido el gramaje por 1/4

^b Para considerar la temporalidad se ha dividido el gramaje por 1/2

^c Para considerar la temporalidad se ha dividido el gramaje por 1/3

^c Para considerar la temporalidad se ha dividido el gramaje por 1/6

DEFINICIÓN DE GRUPOS DE ALIMENTOS	
Nombre del Grupo de Alimentos	Items o alimentos que forman el grupo
LACTEOS (14)	Leche desnatada o semidesnatada
	Leche entera
	Leche condensada
	Yogurt descremado
	Yogurt sin descremar o entero
	Requesón, mató, cuajada
	Queso Blanco o fresco: de Burgos o cabra
	Queso cremoso o en porciones
	Queso curado o semi curado: manchego, bola, gruyére
	Queso azul, roquefort, cabrales
	Natillas, flan, pudding, crema catalana
	Nata o crema de leche
	Batidos de leche: chocolate, vainilla, etc.
	Helados cremosos
HUEVOS (1)	Huevos: fritos, duros, tortilla, etc.
CARNES BLANCAS (3)	Pollo o pavo con piel con sal
	Pato o aves de caza: faisán, perdiz, codornices, etc.
	Conejo o liebre
CARNE ROJA (5)	Carne de ternera, buey, vaca o res
	Carne de cerdo
	Carne de cordero
	Hígado de ternera, cerdo o pollo
	Otras vísceras: sesos, mollejas, callos
EMBUTIDOS (8)	Bacon, tocino y panceta
	Jamón dulce, York o cocido
	Jamón salado: serrano o país
	Fuet salchichón o chorizo curado
	Otros embutidos: mortadela, salami, sobrasada
	Salchichas frescas, morcilla, chistorra
	Frankfurt y similares
Pates, foiegras	
BLANCO (1)	Pescado Blanco: merluza, lenguado, besugo, mero, pescadilla, etc
AZUL (3)	Pescado Azul: sardinas, atún, caballa, bonito, salmón, etc.
	Pescado em salazón: bacalao, anchoas, etc
	Pescado em conserva: sardinas, atún, arenque,...
OTROS (4)	Mejillones, almejas, ostras, llámpares y similares
	Pulpo, calamares o sepia
	Gambas, langostino y similares
	Palitos o delicias de pescado
VERDURAS (17).	Zumo de tomate

	Lechuga, endibias, escarola
	Tomate crudo
	Cebolla
	Rábanos
	Remolacha
	Espárragos
	Zanahoria, calabaza.
	Judías verdes, habichuelas
	Espinacas, acelgas o berros
	Col, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, repollo, berza
	Berenjenas, pepinos, calabacines, bubangos
	Pimientos rojos y verdes
	Champiñones o setas
	Alcachofas
	Puerros
	Ajo
	Zumo de naranja natural
	Zumo o batido de otras frutas naturales: fresas mango, papaya, etc
	Naranja, pomelo, mandarinas
	Plátano
	Manzana o pera
	Uva
	Kiwi
	Fresa o fresones
	Cerezas o picotas
	Melocotón, nectarina, albaricoques o paraguayos
	Higos frescos
	Sandía, melón
	Mango, papaya
	Aguacate
FRUTAS (15)	Aceitunas
FRUTOS SECOS (1)	Frutos Secos: almendras, cacahuetes, avellas, nueces
	Guisantes
LEGUMBRES (2)	Legumbres: lentejas, garbanzos, fabas pintes o blanques, etc
	Arroz
CEREALES, PASTAS(2)	Pasta :espagueti, macarrones, etc
	Patatas: cocidas, asadas, puré, patatas arrugadas
	Bolsa d patatas fritas o "chips"
PATATAS (3)	Patatas fritas

	Pan Blanco
	Pan Integral
PAN (3)	Roscas, rosquilletas, picos, palitos y similares
	Frutas en almíbar: melocotones, peras, piña, etc
	Frutas desecadas: ciruela, albaricoque, pasas, dátiles, higos.
	Galletas sin chocolate tipo Maria
	Galletas con chocolate
	Croissant, donut, ensaimada, napolitana
	Magdalena
	Pastel, tarta
	Churros, porras o masa fina
	Chocolate, bombones
	Chocolate en polvo
	Mermelada, confitura, miel
	Azúcar em café, postres o zumos
	Turrón
DULCES (14)	Mantecados, polvorones, mazapán, panallets
	Refrescos con cola:coca-cola, pepsi
	Otros refrescos: naranja, limón ...
	Zumo de envasado.
BEBIDAS AZUCAR (4)	Horchata
	Café descafeinado
	Café
	Té
CAFÉ, TE (4)	Infusiones de hierbas
	Vino Blanco o rosado
	Vino tinto
	Cerveza con Alcohol
	Champan
	Vino Dulce, jerez, vermouth o similar
	Brandy, coñac, ginebra, ron, whisky, orujo, vodka, aguardiente
BEBIDAS CON ALCOHOL (7)	Licores, anisetes, pacharán
GRASA ANIMAL (2)	Mantequilla
	Manteca
	Mayonesa
	Aceite de Oliva
	Aceite de Girasol
GRASA VEGETAL (4)	Margarina

	Gazpacho
	Croquetas
	Empanadillas o arepas
	Raviolis, canelones, lasaña
	Sopas y cremas de sobre
	Salsa de tomate
	Pizza o empanada
PREPARADOS (8)	Gofio
	Picantes: tabasco, pimienta, guindilla, mojo
CONDIMIENTOS/ ESPECIAS (2)	Sal

LISTADO DE NUTRIENTES*

Abreviatura	Nombre	Unidades
CALS	Calorías	Kcal
<i>Macronutrientes</i>		
PROT	Proteína	g
CARB	Hidratos de Carbono	g
SUGAR	Azúcares Totales	g
CMLPX	Carbohidratos complejos	g
FIBER	Fibra dietética	g
FIBI	Fibra insoluble	g
FIBS	Fibra soluble	g
FAT_T	Grasa Total	g
FAT_S	Grasa saturadas	g
FAT_M	Grasa monoinsaturadas	g
FAT_P	Grasa poliinsaturadas	g
TRANS	Ácidos grasos trans	g
CHOL	Colesterol	mg
<i>Acidos grasos de interes</i>		
Ag16_0(Palmitico)	16:0, palmítico	g
Ag18_0(Esteárico)	18:0, esteárico	g
Ag18_1(Oleico)	18:1, oléico	g
Ag18_2(Linoleico)	18:2, linoléico	g
Ag18_3(Linolenico)	18:3, linolénico	g
Ag20_4(Araquidónico)	20:4, araquidónico	g
Ag20_5(EPA)	EPA	g
Ag22_6(DHA)	DHA	g
OMEGA3	Omega 3	g
OMEGA6	Omega 6	g
<i>Vitaminas</i>		
VITA	Vit. A total	En mcg de RE
RETINOL	Retinol	En mcg de RE
CAROT	Carotenos total	En mcg de RE
A_CAR	Alfa-caroteno	mcg
B_CAR	Beta-caroteno	Mcg
CRYPTO	Cryptoxantina	Mcg
LUT+ZE	Luteína-zeaxantina	Mcg
LYCO	Licopeno	Mcg
B6	Vitamina B6	MG
B12	Vitamina B12	Mcg
VITC	Vitamina C	MG
VITD	Vitamina D	Mcg
VITE	Vitamina E	MG
FOLA	Folato	Mcg
<i>Minerales</i>		
CALC	Cálcio (Ca)	MG
IRON	Hierro (Fe)	MG
MAGN	Magnésio (Mg)	MG
POTAS	Potasio (K)	MG
SOD	Sódio (Na)	MG
ZINC	Zinc (Zn)	MG
YODO	Yodo (I) con Sal Marina	Mcg

<i>Otros</i>		
H2O	Agua	G
ALCO	Alcohol	G
CAFF	Cafeína	Mg
SUGARA	Azucar añadido	G

* Bajo demanda se pueden obtener la estimación de otros nutrientes.

CONSIDERACIONES SOBRE ALGUNOS NUTRIENTES

Fibra dietética = Fibra soluble + fibra insoluble

Grasa total = grasa saturada + grasa monoinsaturada + grasa poliinsaturada

- Grasa saturada, monoinsaturada y poliinsaturada pueden no coincidir con el total de grasa debido a la presencia de glicerol en la molécula de grasa total, y / o la presencia de ácidos grasos trans en los alimentos. El tipo de grasas en las recetas y alimentos combinación puede variar mucho dependiendo de los tipos de aceites o grasas utilizados en ellos. Además, los fabricantes pueden enumerar varios tipos de aceites en sus ingredientes, y las fuentes de abastecimiento varían durante el año.

Omega 3 = 18:3 (linolénico) + EPA (22:5) + DHA (22:6)

Omega 6 = 18:2 (linoleico) + Araquidónico (20:4)

Vitamina A:

Vitamina A total (RE ó mcg) = retinol (RE) + carotenoides (RE)

Carotenoides RE ó mcg = [β -caroteno(mcg)/6]+[(α -caroteno (mcg) + cryptoxantina (mcg) /12]

Folato:

El Folato utilizado es el Folate Food (Folato propio del alimento), excepto para cereales, donde se utiliza el Folate DFE = folate food + 1,7 • folic acid (Ácido Fólico proveniente de la fortificación del alimento)

Vitamina E:

Vitamina E (mg) es la suma de todas las formas(alpha, beta, gama, delta)

1 IU Vitamin E

= 0.67 mg RRR-alpha-tocopherol (natural)

= 0.909 mg all rac alpha-tocopherol (sintetico)

1 mg alpha-tocopherol =1 equivalente alpha-tocopherol

Azúcar añadido:

Para los ítems natillas, leche condensada, helado, refrescos, galletas maria, galletas con chocolate, bollería, chocolate en polvo, zumo de frutas envasado, mermelada y azúcar, se considera los azucares totales (SUGAR) como azúcares añadidos (SUGARA).

AMED

Para realizar el cálculo del Alternate Mediterranean Diet Score nos hemos basado de nuevo en el artículo del American Journal of Clinical Nutrition "Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction" Teresa T Fung, L McCullough & cols y concretamente en la siguiente tabla:

Alternate Mediterranean Diet Score (5, 6)

Food group	Foods included	Criteria for 1 point ¹
Vegetables	All vegetables except potatoes	Greater than median intake (servings/d)
Legumes	Tofu, string beans, peas, beans	Greater than median intake (servings/d)
Fruit	All fruit and juices	Greater than median intake (servings/d)
Nuts	Nuts, peanut butter	Greater than median intake (servings/d)
Whole grains	Whole-grain ready-to-eat cereals, cooked cereals, crackers, dark breads, brown rice, other grains, wheat germ, bran, popcorn	Greater than median intake (servings/d)
Red and processed meats	Hot dogs, deli meat, bacon, hamburger, beef	Less than median intake (servings/d)
Fish	Fish and shrimp, breaded fish	Greater than median intake (servings/d)
Ratio of monounsaturated to saturated fat	—	Greater than median intake (servings/d)
Ethanol	Wine, beer, "light" beer, liquor	5–25 g/d

¹ 0 points if these criteria are not met.

Ítems del aMED

VEGETABLES: Zumo de tomate+ Lechuga, endibias, escarola+Tomate crudo+rábanos+Remolacha+Espárragos+Zanahoria, calabaza+Judías Verdes, habichuelas+ Espinacas, acelgas o berros+Col, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, repollo, berza+Berenjenas, pepinos, calabacines, bubangos + Pimientos rojos y verdes+Champiñones o setas+Alcachofas+Puerros+Ajo+Salsa de Tomate

LEGUMES: Legumbres: lentejas, garbanzos, gabas pintas o blanques, etc.+ Guisantes

FRUITS: Zumo de naranja natural+Zumo o batido de otras frutas naturales: fresas, mango, papaya, etc + naranja, pomelo, mandarinas + plátano +manzana o pera+ uva+ kiwi+fresa o fresones+ cerezas o picotas+ melocotón, nectarina, albaricoques o paraguayos+Higos frescos+ Sandía, melón+Mango, papaya+Aguacate+Aceitunas.

NUTS: Frutos Secos

WHOLE GRAINS: Pan Integral

FISH: Pescado Blanco+Pescado Azul+Pescado en Salazón+Pescado en conserva+Mejillones, almejas, ostras, llámpares y similares+Pulpo, calamares o sepia+Gambas, langostino y similares+Palitos o delicias de pescado

MEAT: Carne de ternera, buey, vaca o res+carne de cerdo+Carne de cordero+Hígado de ternera, cerdo o pollo+Otras vísceras+ Bacón, tocino y panceta+Jamón dulce: York o cocido+Jamón salado+fuet salchichón o chorizo curado+Otros embutidos+salchichas frescas, morcilla, chistorra+Frankfurt y similares+Pates, foiegras.

AHEI

Para realizar el cálculo de este índice nos hemos basado en el artículo de la revista "Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction" de los autores Teresa T Fung, L McCullough & cols y concretamente en la siguiente tabla

DIET AND PLASMA BIOMARKER CONCENTRATIONS

171

Alternate Healthy Eating Index (2)

Component	Foods included	Criteria	Score
Vegetables	All vegetables, tomato products, yams, pizza (does not include potatoes)	5 servings/d	10; 1 point less for each 10% less than intake required for full score
Fruit	All fruit and fruit juices	4 servings/d	Same as above
Nuts and soy	Tree nuts, peanuts, peanut butter, tofu, soy milk	1 servings/d	Same as above
Ratio of white to red meat	White: chicken, seafood; red: processed meats, red meats, organ meats	4	Same as above
Cereal fiber	—	15 g/d	Same as above
<i>trans</i> Fat	—	≤0.5% of energy >0.5 but <4.0% of energy	10 1 point less for each 10% increment in this range
Ratio of polyunsaturated to saturated fat	—	≥4 ≥1	0 10; 1 point less for each 10% less than intake required for full score
Long-term multivitamin use	—	≥5 y	7.5 points for ≥5 y regular use; 2.5 for all others
Alcohol	Red and white wine, beer, "light" beer, liquor	Men: 1.5–2.5 servings/d; women: 0.5–1.5 servings/d Intake < "ideal" Intake > "ideal" Men: 0 or > 3.5 servings/d; women: 0 or >2.5 servings/d	10 1 point less for each 10% less than ideal intake 1 point less for each 10% above than ideal intake 0 0

Se han obviado las puntuaciones de multivitamians

items -AHEI

VEGETABLES: Zumo de tomate+ Lechuga, endibias, escarola+Tomate crudo+rábanos+Remolacha+Espárragos+Zanahoria, calabaza+Judías Verdes, habichuelas+ Espinacas, acelgas o berros+Col, coliflor, brócoli, coles de Bruselas, repollo, berza+Berenjenas, pepinos, calabacines, bubangos + Pimientos rojos y verdes+Champiñones o setas+Alcachofas+Puerros+Ajo+Salsa de Tomate
+ Legumbres: Lentejas, garbanzos, judías pintas o blancas + Guisantes Cocinados

FRUITS: Zumo de naranja natural+Zumo o batido de otras frutas naturales: fresas, mango, papaya, etc + naranja, pomelo, mandarinas + plátano +manzana o pera+ uva+ kiwi+fresa o fresones+ cerezas o picotas+ melocotón, nectarina, albaricoques o paraguayos+Higos frescos+ Sandía, melón+Mango, papaya+Aguacate+Aceitunas.

NUTS: Frutos Secos

WHITE MEAT: Pollo o pavo+Pato o aves de caza+ Conejos o liebre+ Pescado Blanco+Pescado Azul+Pescado en Salazón+Pescado en conserva+Mejillones, almejas, ostras, llámpares y similares+Pulpo, calamares o sepia+Gambas, langostino y similares+Palitos o delicias de pescado

RED MEAT: Carne de ternera, buey, vaca o res+carne de cerdo+Carne de cordero+Hígado de ternera, cerdo o pollo+Otras vísceras+ Bacón, tocino y panceta+Jamón dulce: York o cocido+Jamón salado+fuet salchichón o chorizo curado+Otros embutidos+salchichas frescas, morcilla, chistorra+Frankfurt y similares+Pates, foiegras.

CEREAL: Pan Integral

Referencias:

1. USDA Agricultural Research Service. USDA national nutrient database for standard reference, release 20. Nutrient Data Laboratory Home Page. 2007 [cited 2008 30 May]. Available from:<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/hdl>.
2. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA Nutrient Data Laboratory. 2008. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21. USDA Nutrient Data Laboratory website: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>
3. Food Standards Agency (2002) McCance and Widdowson's The Composition of Foods, Sixth summary edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
4. Centre d'Ensenyament Superior de Nutrició i Dietètica (CESNID, 2008). Tablas de composición de alimentos por medidas caseras de consumo habitual en España. Edition: McGraw-Hill Interamericana
5. Olivares A, Bernal M, Ros G, Martínez C, Periago M. Quality of data on folic acid content in vegetables included in several Spanish Food Composition Tables and new data on their folate content. *Nutr Hosp* 2006; 21: 97-108.
6. Vicario I, Griguol V, León-Camacho M. Multivariate characterization of the fatty acid profile of Spanish cookies and bakery products. *J Agric Food Chem* 2003;51(1):134-9.
7. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. La Alimentación en España. Madrid, 2006
8. Larqué, E., Garaulet, M., Pérez-Llamas, F., Zamora, S., Tebar, J. 2003. Composición en ácidos grasos de las margarinas de mayor consumo en España y su importancia nutricional. *Grasas y Aceites* 54, 65-70.
9. Griguol V, León-Camacho M, Vicario I. 2007. Revisió de los niveles de ácidos grasos trans encontrados en distintos tipos de alimentos. *Grasas y Aceites* 58, 87-98

