



**Universidad de Oviedo**

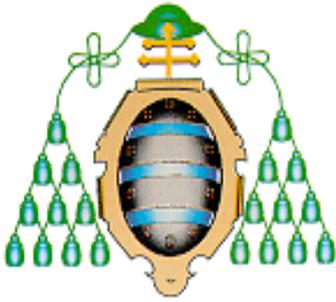
**Programa de Doctorado “Investigación en Cáncer”**

**“Polimorfismos en genes reguladores del ciclo  
celular y riesgo de cáncer de pulmón”**

**TESIS DOCTORAL**

**Ana Souto García  
14/09/2015**





## **Tesis Doctoral**

# **“Polimorfismos en genes reguladores del ciclo celular y riesgo de cáncer de pulmón”**

**Autora:**  
**Ana Souto García**

**Directora de Tesis:**  
**Adonina Tardón García**





## RESOLUCIÓN DE PRESENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

**Año Académico:2015/2016**

1.- Datos personales del autor de la Tesis		
Apellidos: Souto García	Nombre: Ana	
DNI/Pasaporte/NIE:	Teléfono:	Correo electrónico:
2.- Datos académicos		
Programa de Doctorado cursado: INVESTIGACIÓN EN CÁNCER		
Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS		
Departamento/Instituto en el que presenta la Tesis Doctoral: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA DEL PRINCIPADO DE ASTURIAS		
Título definitivo de la Tesis		
Español/Otro Idioma: POLIMORFISMOS EN GENES REGULADORES DEL CICLO CELULAR Y RIESGO DE CÁNCER DE PULMÓN	Inglés: IPOLYMORPHISMS AT CELL CYCLE CONTROL GENES AND LUNG CANCER RISK.	
Rama de conocimiento: CIENCIAS DE LA SALUD		
Señale si procede: <input type="checkbox"/> Mención Internacional <input type="checkbox"/> Idioma de presentación de la Tesis distinto al español <input type="checkbox"/> Presentación como compendio de publicaciones		
3.- Autorización del Presidente de la Comisión Académica / Director del Departamento		
D/D <sup>a</sup> : AURORA ASTUDILLO GONZÁLEZ	DNI/Pasaporte/NIE:	
Departamento/Instituto: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA		

FOR-MAT-VOA-012

### Resolución

El Departamento INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA en su reunión de fecha 16/09/2015 , acordó la presentación de la tesis doctoral a la Comisión de Doctorado, previa comprobación de que la tesis presentada y la documentación que la acompaña cumplen con la normativa vigente, según lo establecido en el Art.30.7 del Reglamento de los Estudios de Doctorado, aprobado por el Consejo de Gobierno, en su sesión del día 17 de junio de 2013 (BOPA del 25 de junio de 2013)

Además, informa:

	Favorable	Desfavorable
Mención Internacional	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Idioma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Presentación como compendio de publicaciones	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Polimorfismos en genes reguladores del ciclo celular y riesgo de cáncer de pulmón	Inglés: Polymorphisms at cell cycle control genes and lung cancer risk
2.- Autor	
<b>Nombre:</b> ANA SOUTO GARCIA	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en cáncer (Mención de Calidad)	
Órgano responsable: INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA	

### RESUMEN (en español)

En España, el cáncer de pulmón supone una de las principales causas de muerte por cáncer (21487 muertes en 2012). Existen diversas causas que conducen al desarrollo del cáncer, tales como la susceptibilidad genética, ocupación, polución y dieta. La susceptibilidad genética y su relación con el desarrollo del cáncer ha sido ampliamente evaluada.

En el presente trabajo, se procedió a analizar la relación de polimorfismos en genes que regulan el ciclo celular y el riesgo de cáncer de pulmón. Los genes escogidos fueron p21 (regula el paso de la célula de la fase G1), p27 (regula el paso de G1 a S), p16 (regula el paso de G1 a S), MDM2 (regula a p53) y p53 (regula a p21 y tiene un papel fundamental en apoptosis) y los polimorfismos Arg31Ser de p21, V109G de p27, C580T y C540G de p16, SNP309 de MDM2 y Arg72Pro de p53.

Se emplearon muestras biológicas y entrevistas recogidas durante el desarrollo del estudio CAPUA, un estudio caso-control de base hospitalaria. Tanto el genotipado de p21 como el de p53 se llevaron a cabo por amplificación en PCR y digestión con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

El genotipado de los polimorfismos V109G de p27, C540G G580A de p16 y 309 de MDM2 se llevó a cabo usando el MassARRAY SNP genotyping system (Sequenom Inc., San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software STATA versión 8, empleándose análisis univariante, Fisher exacto, regresión logística multivariante no condicionada y  $\chi^2$  cuando fue necesario.

Al hacer el estudio de estos polimorfismos, obtuvimos resultados dispares:

Para el genotipo Ser31Arg en p21, se encontró un riesgo de cáncer de pulmón más alto (ORa= 1,53; IC95%=1,04-2,23) en hombres portadores del alelo Aeg. Centramos el análisis estratificado en el grupo de los hombres, encontrando riesgo significativo en hombres menores de 55 años (ORa= 2,35; IC95%=1,00-5,51), y en fumadores (ORa=1,75; IC95%= 1,21-2,54).

El alelo Arg, además, se asocia con un mayor riesgo de cáncer de pulmón en pacientes con carcinoma de células pequeñas (ORa= 2,11; IC95%= 1,15-3,86), así como en pacientes con carcinoma de células escamosas (ORa=1,39; IC95%=0,86-2,26).

Para el polimorfismo Arg72Pro de p53, se comprobó un aumento de riesgo en el grupo de portadores del alelo Pro para los fumadores (ORa= 1,43; IC95%=1,09-1,86).

En cuanto al polimorfismo V109G no se encontró que la presencia del alelo G supusiera un aumento de riesgo para ninguno de los grupos estudiados, como tampoco se encontró riesgo mayor atribuible a la presencia del alelo G del polimorfismo SNP309 de MDM2 ni aparece riesgo asociado a la presencia del alelo variante para el polimorfismo G580A de p16 ni para el polimorfismo p16 C540G.

Al hacer el análisis combinado de p21 Ser31Arg y p53 Arg72Pro, los hombres con el genotipo



de alto riesgo presentaron un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón (ORa=2.29; IC95%=1.21-4.32). También se reveló un riesgo más elevado para los fumadores (ORa= 3.61; IC95%=1.80-7.22). Se encontró que un incremento del riesgo de desarrollar carcinoma epidermoide (ORa=2.52; IC95% =1.15-5.53) y de células pequeñas (ORa= 4.22; IC95%= 1.65-10.77) en el grupo de individuos con genotipo de alto riesgo. Al estudiar el efecto combinado de p21 Ser31Arg y V109G de p27 se encontró un aumento de riesgo para el genotipo de alto riesgo para los fumadores (ORa=3.11; IC 95% =1.14-8.47) y para el carcinoma microcítico (ORa=2.34; IC95%=1.02-5.35). En cuanto al análisis conjunto de p53 Arg72Pro y SNP309 de MDM2, se encontró que para el grupo de alto riesgo se observaba un aumento de riesgo en el grupo de los exfumadores (ORa=1.97; IC95%=1.17-3.33).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, habiendo encontrado ausencia de asociación en los polimorfismos estudiados individualmente, pero encontrando asociación con un mayor riesgo al estudiarlos de forma combinada, ahondan en la idea del efecto combinado y no aislado de los polimorfismos en el desarrollo del cáncer de pulmón.

El gran tamaño de muestra procedente de una población homogénea de similar ascendencia (877 casos y 841 controles) y la alta participación de los casos elegibles representan algunas de las fortalezas de nuestro estudio. Además, todos los casos fueron confirmados patológicamente. Por otro lado, una limitación potencial es el haber escogido controles de base hospitalaria. También puede haber un sesgo de recuerdo, al haberse obtenido la información sobre variables de confusión de forma retrospectiva. Sin embargo, todos los estimadores obtenidos para la principal variable de confusión, el tabaco, están en línea con la literatura.

### RESUMEN (en Inglés)

In Spain, lung cancer is a leading cause of death from cancer (21,487 deaths in 2012). There are several causes that lead to cancer development, such as genetic susceptibility, occupation, pollution and diet. Genetic susceptibility and its relationship to cancer development has been extensively evaluated.

In this study, we proceeded to analyse the relationship of polymorphisms in genes that regulate the cell cycle and the risk of lung cancer. The following genes and polymorphisms were chosen: p21 (G1 phase checkpoint), p27 (regulates passage from G1 to S), p16 (regulates passage from G1 to S), MDM2 (regulates p53) and p53 (regulates p21 and plays a fundamental role in apoptosis) and p21 Arg31Ser, p27 V109G, C580T and C540G p16, SNP309 MDM2 and p53 Arg72Pro.

Biological samples and interview data collected during the development of CAPUA study, a case-control study of hospital-based samples were used. Both p21 and p53 genotyping were carried out by PCR amplification and restriction enzyme digestion and agarose gel electrophoresis.

Genotyping of polymorphisms p27 V109G, p16 C540G G580A and MDM2 309 was carried out using the SNP genotyping MassARRAY system (Sequenom Inc., San Diego, CA) following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis of the results was performed using STATA version 8 software, using univariate analysis, Fisher exact, unconditional and multivariate logistic regression  $\chi^2$  when necessary.

Upon study of these polymorphisms, we obtained different results:

For the p21 Ser31Arg genotype a higher risk of lung cancer was found (aOR = 1.53; 95%CI =



1.04-2.23) in male carriers of the allele Arg. Stratified analysis focused on the group of men, finding significant risk in men younger than 55 years (aOR = 2.35; 95%CI = 1.00-5.51) and smokers (aOR = 1.75, 95 %CI =1.21-2.54) . The Arg allele also is associated with an increased risk of lung cancer in patients with small cell carcinoma (ORa = 2.11; 95%CI = 1.15-3.86) and in patients with carcinoma cells squamous (aOR = 1.39; 95%CI = 0.86-2.26).

For Arg72Pro polymorphism of p53, an increased risk for smokers was found in Pro allele carriers (aOR = 1.43; 95%CI = 1.09-1.86).

Regarding the polymorphism V109G we didn't find an increased risk for any of the groups studied related to the presence of the G allele. Neither a higher risk due to the presence of the G allele of SNP309 polymorphism MDM2 was found, nor a higher risk is associated with the presence of the variant allele for the G580A polymorphism of p16 or p16 C540G polymorphism. Upon combined analysis of p21 Ser31Arg and p53 Arg72Pro, men with high-risk genotype showed an increased risk of developing lung cancer (aOR = 2.29; 95%CI = 1.21-4.32). A higher risk for smokers (aOR = 3.61; 95%CI = 1.80-7.22) was also revealed. It was found that an increased risk of developing squamous cell carcinoma (aOR = 2.52; 95%CI = 1.15-5.53) and small cell carcinoma (aOR = 4.22; 95%CI = 1.65-10.77) in the group of individuals with high-risk genotype.

As for the combined effect of p21 Ser31Arg and p27 V109G, an increased risk for high-risk genotype was found for smokers (adjusted OR = 3.11; 95%CI = 1.14-8.47) and for small cell carcinoma (aOR = 2.34; 95%CI = 1.02-5.35)

As for the combined analysis of p53 Arg72Pro and MDM2 SNP309, we found that for the high-risk group, an increased risk in former smokers was observed (aOR = 1.97; 95%CI = 1.17-3.33).

The results obtained in our study, having found no association when analysing the polymorphisms individually, but finding an increased risk associated with their combined effect, delve into the idea of combined effect and not isolated of polymorphisms in the development of lung cancer.

The large sample size from a homogeneous population similar ascent (877 cases and 841 controls) and the high participation of eligible cases represent some of the strengths of our study. In addition, all cases were confirmed pathologically. Furthermore, a potential limitation is the control hospital choosing base. There may also be recall bias, as the information about confounding variables has been obtained retrospectively. However, all the estimators obtained for major confounding variable, tobacco, are in line with the literature.



## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible la conclusión de esta tesis doctoral:

A la doctora Adonina Tardón García, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Epidemiología Molecular del Cáncer, por confiar en mi y dirigir este trabajo de tesis.

A todo el personal de los Servicios de Neumología de los Hospitales de Cabueñes de Gijón, San Agustín de Avilés y Álvarez Buylla de Mieres, especialmente a la Dra. Teresa Pascual, al Dr. Manuel G Marrón y a la Dra. Marta García Clemente por las horas dedicadas al estudio CAPUA y por haber facilitado durante el desarrollo del estudio la actividad de los entrevistadores.

A los pacientes y sus familiares, que tan desinteresadamente han sido participantes en el estudio CAPUA.

A Ana por su inestimable ayuda con la estadística y por la compañía durante estos años.

A todas las personas que han pasado por el equipo llevando a cabo las entrevistas y la recogida transporte de muestras, en especial a Cris, por seguir al pie del cañón año tras año.

A Sara, por todas las horas codo con codo en el laboratorio, por entenderme y animarme con el trabajo diario.

A Pachi y a Feli, por ayudarme a dar los primeros pasos en el laboratorio, y por todos los momentos compartidos dentro y fuera de él.

A los mi familia, a mis amigos y a Pelayo por su paciencia y su apoyo.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1. CÁNCER DE PULMÓN .....	1
1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón .....	1
1.2. Biología del cáncer de pulmón .....	6
2. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA .....	9
3. CICLO CELULAR .....	10
4. GENES REGULADORES DEL CICLO CELULAR .....	12
4.1. El gen <i>p21</i> .....	12
4.2. El gen <i>CDKN1B (p27)</i> .....	16
4.3. El gen <i>CDKN2 (p16)</i> .....	18
4.4. El gen <i>MDM2</i> .....	19
4.5. El gen <i>p53</i> .....	21
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
1. MATERIAL .....	28
1.1. Enzimas y reactivos de Biología Molecular .....	28
1.2. Muestras biológicas .....	28
2. MÉTODOS .....	29
2.1. Diseño del estudio .....	29
2.1.1. Sujetos de estudio .....	29
2.1.2. Datos sociodemográficos y factores de riesgo .....	30
2.1.3. Datos clínicos .....	31
2.2. Análisis estadístico .....	31
2.3. Biología Molecular .....	32
2.3.1. Extracción de ADN genómico .....	32
2.3.2. Determinación del polimorfismo <i>p21 Ser31Arg</i> .....	32
2.3.3. Determinación del polimorfismo <i>p53 Arg72Pro</i> .....	34
2.3.4. Determinación de los polimorfismos <i>p27 V109G</i> , <i>p16 C540G</i> y <i>G580A</i> y <i>MDM2</i> <i>SNP 309</i> .....	35
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>

1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN .....	41
2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Ser31Arg DEp21 .....	42
3. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMOArg72ProDEp53 .....	45
4. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMOV109GDEp27 .....	47
5. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO309DEMDM2.....	49
6. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMOG580ADEp16 .....	51
7. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMOC540GDEp16 .....	53
8. ANÁLISIS COMBINADO DE POLIMORFISMOS.....	55
8.1. Análisis combinado de los polimorfismos p21 Ser31Arg y p53 Arg72Pro .....	55
8.2. Análisis combinado de los polimorfismos p21 Ser31Arg y V109G de p27 .....	56
8.3. Análisis combinado de los polimorfismos p53 Arg72Pro y SNP309 de MDM2 .	59
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## ABREVIATURAS

A: Adenina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Arg: Arginina

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ATP: Adenosín trifosfato

C: Citosina

CDKs: Cyclin-dependent kinases (quinasas dependientes de ciclina)

CDKN: cyclin-dependent kinase inhibitor

EDTA: Etilen-diamino tetracetato sódico

G: Guanina

HPV: Virus del papiloma humano (Human Papilloma Virus)

IARC: International Agency for Research on Cancer

IC: Intervalo de Confianza

INE: Instituto Nacional de Estadística

min.: minutos

NER: Reparación por Excisión de Nucleótidos (Nucleotide Excision Repair)

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

pb: pares de bases

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular (Proliferating cell Nuclear Antigen)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

Pro: Prolina

RFLP: Polimorfismos de la Longitud de Fragmentos de Restricción (Restriction Fragments length Polymorphism)

rpm: revoluciones por minuto

SDS: Dodecil sulfato sódico

Ser: Serina

SNP: Polimorfismo de un Solo Nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)

Taq: Polimerasa *Thermus aquaticus*

T: Timina

TOFT: tissue organization field theory

Tris: tris-hidroxi-metil-amino metano

WAF1: Wild-type *p53*-activated fragment 1

Wt: Wild-type

## **INTRODUCCIÓN**

## **1. CÁNCER DE PULMÓN**

### **1.1. Epidemiología del cáncer de pulmón:**

El cáncer constituye un problema de salud de primera magnitud, siendo la tercera causa de mortalidad en el mundo. Según datos de la IARC, en 2012 murieron 8,2 millones de personas por causa del cáncer y se diagnosticaron 14,1 millones de casos nuevos. En ese mismo año, se contabilizaron 32,6 millones de casos prevalentes de cáncer (diagnosticado durante los últimos cinco años)[1]. Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. De entre estos factores, el consumo de tabaco se revela como factor de riesgo más importante, siendo la causa del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y del 70% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón. Desde 1985, el tumor más frecuente en el mundo es el de pulmón. De los 8,2 millones de personas que murieron en 2012 a causa del cáncer, 1,59 lo hicieron por causa del cáncer de pulmón [2].

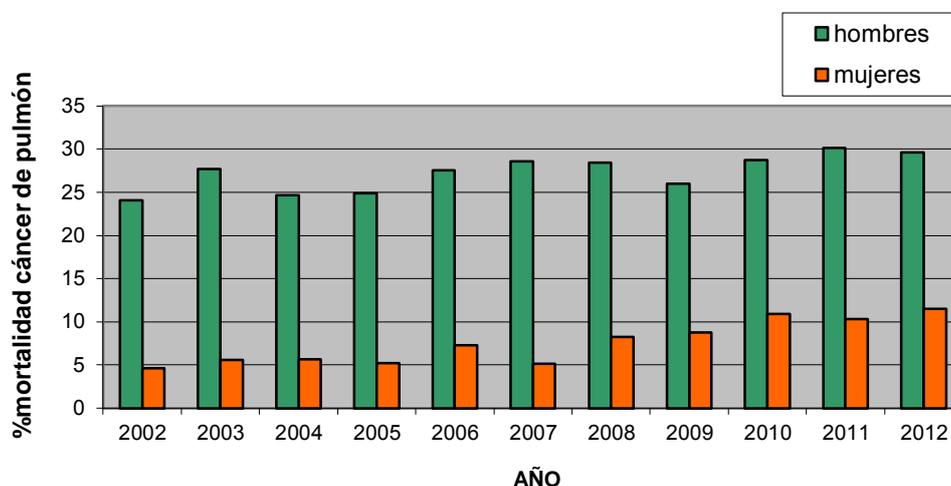
En España, en el año 2012 se produjeron 110.993 muertes por cáncer, lo que supone un 27,5% del total de defunciones y lo convierte en la segunda causa de mortalidad en nuestro país. La mortalidad por tumores mantiene su tendencia ascendente de los últimos años, incrementándose un 1,5% con respecto a 2011. Por sexos, los tumores ocupan el primer lugar como causa de mortalidad masculina (296,3 fallecidos por cada 100.000) y el segundo en el caso de las mujeres (180,0 por cada 100.000), por detrás de las enfermedades cardiovasculares. En nuestro país hay más de 20.000 muertes por cáncer de pulmón al año, siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer. Entre los hombres, el cáncer de pulmón es el primero en importancia con 17.661 muertes en 2012, mientras que en el caso de las mujeres supone la tercera causa de muerte por cáncer (3.826 muertes), por detrás de mama y colon y recto. Estos números suponen un aumento de la mortalidad por este tipo de tumor de un 2% con respecto al año anterior (2011) [3]. Como se puede observar en la tabla 1, en el caso de los hombres, el número de muertes por cáncer de pulmón supera al de muertes por tumores de colon y recto y próstata juntos, lo que da buena idea de la magnitud del problema que supone esta enfermedad para la población.

**Tabla 1.** Mortalidad por tumores en España en el año 2012 (todas las edades) (INE)

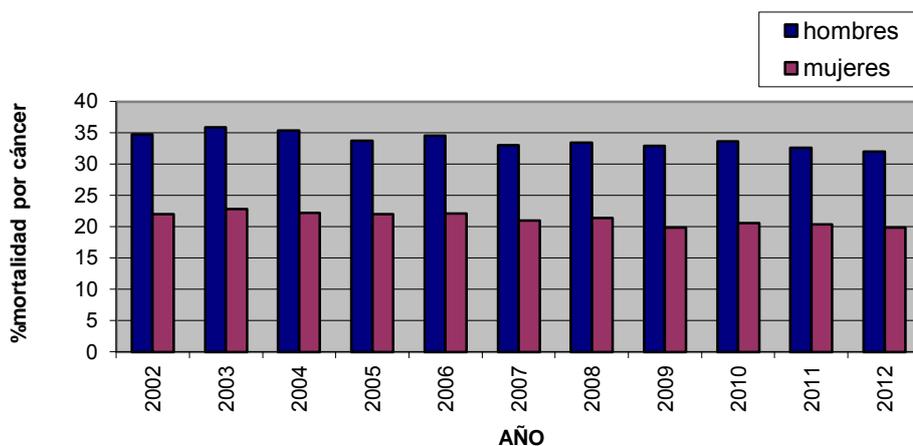
<b>HOMBRES</b>		<b>MUJERES</b>		
1º	Pulmón	17.683	Mama	6.282
2º	Colon y recto	9.362	Colon y recto	6.242
3º	Próstata	6.045	Pulmón	3.828
4º	Vejiga	4.320	Páncreas	2.855
5º	Hígado	3.382	Tej. linfático, órganos hematopoyéticos y afines	2.319
6º	Estómago	3.482	Tumores mal definidos	2.307
7º	Páncreas	3.121	Estómago	2.200
8º	Tumores mal definidos	2.634	Ovario	1.887
9º	Tej. linfático, órganos hematopoyéticos y afines	2.500	Hígado	1.634
10º	Leucemia	1.959	Leucemia	1.572

Al igual que en el resto de España, la mortalidad por cáncer en el Principado de Asturias es más acusada en hombres que en mujeres, y ligeramente superior a la española, con un 28,4% del total de muertes. Así mismo, esta diferencia se hace especialmente notable en el caso de la mortalidad por cáncer de pulmón. En hombres, la mortalidad por cáncer de pulmón supone un 26,3% del total de muertes por cáncer, mientras en mujeres este porcentaje se reduce al 11,5%. Ese porcentaje de mortalidad por cáncer de pulmón ha ido aumentando en los últimos años, pasando de un 4,6% en 2002 hasta este 11,5% del año 2012, lo que puede estar reflejando la aparición de los efectos del consumo del tabaco por las mujeres (consumo que comenzó más tarde que en los hombres).

**Figura 1.** Porcentaje de fallecidos por cáncer de pulmón en relación al número de fallecidos por cáncer en el Principado de Asturias 2002-2012 (INE) [3].



**Figura 2.** Porcentaje de fallecidos por cáncer en relación con el número total de muertes en el Principado de Asturias 2001-2011 (INE) [3].



A diferencia de otros tumores, donde la carga genética parece jugar un papel más destacado, un porcentaje de entre el 80 y el 90% de los casos de cáncer de pulmón se atribuye a factores medioambientales (tabaco, ocupación, contaminación atmosférica, etc.), que actúan en conjunto con la susceptibilidad genética individual, por lo que a priori este tipo de cáncer podría ser evitable. Si bien existen múltiples factores de riesgo ambientales asociados con la etiología de este tumor, el tabaco es sin duda el principal determinante de la incidencia de cáncer de pulmón tanto en hombres como en mujeres.

Según el último informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sobre la prevalencia del consumo de tabaco en el mundo, el 12% de las muertes producidas en individuos de 30 o más

años son atribuibles al tabaco. La proporción de mortalidad atribuible al tabaco es mayor en hombres que en mujeres, y se considera que el tabaco es responsable del 22% de las muertes por cáncer. Las regiones donde la proporción de muertes atribuibles al tabaco es mayor son América y Europa, ya que el uso de tabaco en estas regiones lleva produciéndose durante un mayor período de tiempo. En el caso del cáncer de pulmón, el 71% de las muertes producidas es atribuible al tabaco. Para el caso concreto de España (datos de 2004), la proporción de mortalidad por cáncer de pulmón atribuible al tabaco se eleva hasta el 84%. Las regiones donde la proporción de muertes atribuibles al tabaco es mayor son América y Europa, ya que el uso de tabaco en estas regiones lleva produciéndose durante un mayor período de tiempo [4].

Así pues, el consumo de tabaco, principalmente cigarrillos, es la causa principal del desarrollo del cáncer de pulmón. El determinante más fuerte de cáncer de pulmón en fumadores, es la duración del consumo de cigarrillos; cuanto antes se empiece y más dure el hábito, mayor es el riesgo, que también aumenta con el número de cigarrillos que se consumen. El hecho de que sea la duración del hábito de fumar el mayor determinante se debe en parte a que la estimación del número de cigarrillos consumidos no es un reflejo claro de la intensidad con la que se fuma, ya que este parámetro depende también de lo profundo que se inhale, el número de caladas que se da a cada cigarrillo y el tiempo de retención del humo en el pulmón. El consumo de tabaco se ha relacionado con todos los tipos histológicos de cáncer de pulmón, habiéndose demostrado una asociación más fuerte con el adenocarcinoma en los últimos años. Los efectos carcinogénicos del tabaco se presentan por igual en hombres y en mujeres.

**Tabla 2.** Algunos carcinógenos presentes en el humo del tabaco

<b>Familia de compuestos</b>	<b>Clasificación IARC</b>	<b>Ejemplos</b>
HAPs	2A, 2B	Benzo[a]antraceno
Hidrocarburos heterocíclicos	2B	Furano
Nitrosaminas	2A, 2B	N'nitrosornicotina
Aminas aromáticas	1, 2A, 2B	<b>2-naftilamina, 4-aminobifenil</b>
Aldehídos	2A, 2B	Acetaldehído
Hidrocarburos volátiles	1, 2A, 2B	<b>Benceno</b>
Compuestos orgánicos	1, 2A, 2B	<b>Cloruro de vinilo, óxido de etileno</b>
Metales	1, 2A, 2B	<b>Arsénico, berilio, níquel, cromo hexavalente, cadmio</b>

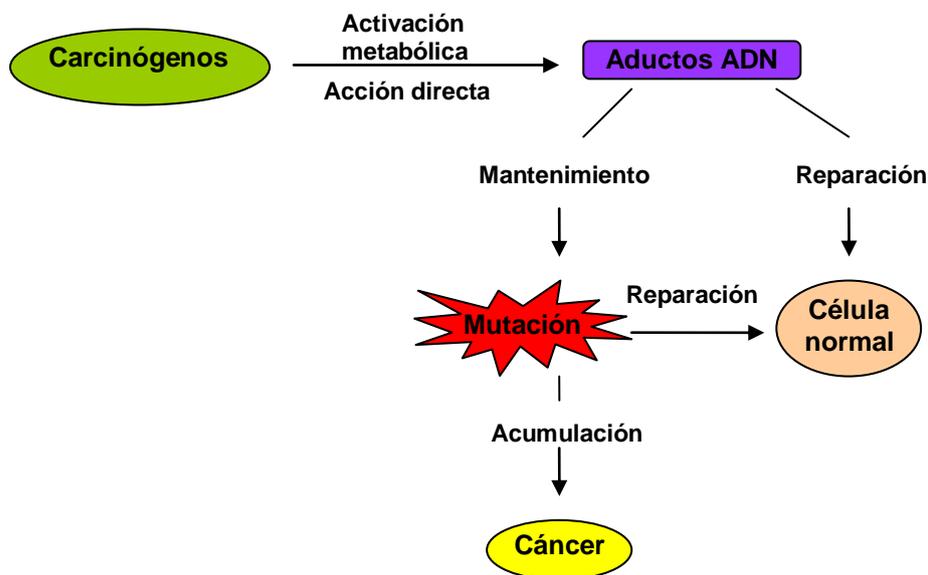
-Clasificación IARC: 1 carcinógeno, 2A probablemente carcinógeno, 2B posiblemente carcinógeno

-En negrita, los carcinógenos tipo 1

-HPAs: hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La exposición continuada a los carcinógenos presentes en el tabaco supone la formación de aductos en las cadenas de ADN, bien sea por interacción directa de los compuestos con el ADN (como ocurre en el caso del óxido de etileno) o tras su metabolización y conversión en compuestos tóxicos, que deben ser reparados. La eficacia de los sistemas de reparación en diferentes individuos no es la misma, por lo que estas variaciones pueden influir en el riesgo a padecer cáncer. En caso de que los aductos no sean reparados, se provoca un desapareamiento durante la replicación que puede desencadenar una mutación permanente. Estas mutaciones pueden conducir a la alteración en la expresión de oncogenes o genes supresores de tumores que derivan en la aparición de tumores [5].

**Figura 3.** Acción de los carcinógenos presentes en el tabaco en el desarrollo de la carcinogénesis.



Por tanto, el tabaquismo es la principal causa prevenible de cáncer, existiendo una relación causa-efecto probada en distintos tumores, además del de pulmón. Así mismo, existe evidencia científica suficiente para demostrar el papel que juega la exposición pasiva al humo de los cigarrillos en el aumento de riesgo de padecer cáncer de pulmón. El riesgo relativo medio de padecer este tipo de cáncer atribuido a esta causa es de 1,25 (IC 95%=1,15-1,37), según lo obtenido en un meta-análisis que incluye 51 estudios con 7.369 casos [6].

Existen ciertas diferencias entre el humo inhalado mientras se fuma que el que se desprende del cigarrillo. Debido a su rápida dilución y dispersión, sus propiedades fisicoquímicas varían. El principal cambio físico consiste en una disminución en la proporción de componentes del humo en

la fase particulada en lugar de en la fase vapor del humo, por lo que las partículas presentes en humo "pasivo" tienen un tamaño medio menor que el de las presente en el humo del tabaco fumado. Debido a la variedad de comportamientos de los compuestos presentes en el tabaco frente a su exposición con el medio, la mezcla de moléculas presentes en el humo que se desprende del cigarrillo es muy variable y por tanto los efectos de la exposición pasiva no pueden determinarse a partir de los componentes individuales.

Según datos analizados por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer en una de sus monografías, el exceso de riesgo debido a la exposición pasiva al humo del tabaco es del 20% en mujeres y del 30% en hombres, datos que se mantienen tras ajustar los parámetros por posibles sesgos y factores confusores. Según estos datos, se evidencia la relación causa-efecto entre el tabaquismo pasivo y el cáncer de pulmón y por tanto este pasa a clasificarse dentro de los cancerígenos de tipo 1 [5].

Dado que en los últimos años empieza a observarse un descenso en la prevalencia de fumadores en la población, se está despertando un interés creciente en el estudio del cáncer de pulmón no ligado al consumo de tabaco, que presenta unas características propias, como demuestra el hecho de que su incidencia sea mayor en las mujeres, o su mejor pronosis. Entre los factores que se asocian a este tipo de cáncer está el ser fumador pasivo, la exposición ocupacional, al radón o al arsénico, las enfermedades pulmonares previas y las infecciones víricas [7,8].

Por otro lado, existen estudios en la literatura que asocian el ejercicio físico con un menor riesgo de padecer cáncer y en concreto, cáncer de pulmón. En un meta-análisis publicado en 2005 por nuestro grupo se concluye que hay indicios consistentes de que la actividad física puede proteger frente a este tipo de tumores [9].

## **1.2. Biología del cáncer de pulmón**

Bajo el término "cáncer" se agrupan más de 200 tipos de tumores diferentes, que presentan características particulares y que, por tanto, pueden considerarse enfermedades diferentes, con un origen y una evolución específica. Sin embargo, existe una característica común a todos los tumores, que es la alteración de los mecanismos de proliferación, crecimiento y muerte celular. A grandes rasgos, podemos encontrar dos tipos de cánceres: tumores hereditarios (en torno al 5% del cáncer en general), cuyas causas genéticas están bien establecidas, como el cáncer de colon hereditario no poliposo, el cáncer de mama hereditario o el retinoblastoma hereditario y los denominados tumores esporádicos, que suponen cerca del 95% del total de casos de cáncer, que son consecuencia de la interacción con ciertos carcinógenos (agentes químicos, físicos y biológicos), como el de pulmón, que está muy influenciado por factores ambientales.

La teoría que más ha prevalecido a lo largo de los últimos cincuenta años a la hora de aproximarse al proceso carcinogénico es la de la mutación somática, que postula que la evolución

del cáncer comienza con una mutación en una célula somática, que sucesivamente acumula múltiples mutaciones. Esta mutación ocurriría en genes relacionados con el control de la proliferación y el ciclo celular, lo que conduciría a la proliferación de las células tumorales y en última instancia acabaría con el desarrollo de un tumor.

Si bien esta aproximación sigue estando vigente, existen ciertas observaciones que no pueden explicarse únicamente con esta teoría, como la regresión espontánea de ciertos tumores, el desarrollo de cáncer cuando tejido normal es trasplantado a otra región del cuerpo o cerca de estroma previamente expuesto a carcinógenos, la alta incidencia de cáncer en pacientes con xeroderma pigmentosa pero no en otros pacientes con defectos similares en los sistemas de reparación de ADN, la inestabilidad genética encontrada en pólipos hiperplásicos no cancerosos, etc.

Así, empiezan a aparecer otras teorías que parecen explicar mejor estos eventos. Entre estas, se puede destacar la del campo de organización del tejido (TOFT, tissue organization field theory) que propone el proceso carcinogénico como un problema de organización tisular semejante a la organogénesis durante el desarrollo temprano, y que el estado base de las células es la proliferación. Otros científicos optan por teorías que contienen elementos de ambas, la aproximación celular teniendo en cuenta el contexto tisular.

En cuanto a los mecanismos de acción, en la teoría de la mutación somática, los carcinógenos actuarían a nivel celular, provocando mutaciones que afectarían a la proliferación de células que podrían convertirse en neoplásicas. En el caso de la TOFT, el desarrollo del cáncer se explicaría por medio de la disrupción en las interacciones de las células que mantienen la organización tisular, la reparación y la homeostasis del entorno provocada por la acción de un elemento carcinógeno. Así, los controles negativos ejercidos por la organización del tejido se verían relajados, permitiendo a las células proliferar y migrar libremente [10,11].

Otra teoría basada en el tejido, más que en la autonomía celular, es el modelo del bucle de retroalimentación (feedback loop model, FLM), que apunta hacia la comunicación alterada entre las células del cáncer y las del estroma debido a un procesamiento de señales anómalo. Una mutación en una célula parenquimal podría alterar los mecanismos intracelulares que regulan la respuesta a diversas señales, y esta falta de comunicación provocaría la persistencia de un estado proliferativo que conduciría al desarrollo del tumor[12].

Retomando el modelo de la mutación somática, los tumores se originan por una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que tienen lugar en diferentes etapas. Comienza con la adquisición de una serie de características en un pequeño grupo de genes que confieren una ventaja proliferativa a las células, que van acumulando alteraciones en pasos sucesivos, como pérdida de alelos, inestabilidad cromosómica, mutaciones en oncogenes, silenciamiento de genes y expresión aberrante de genes implicados en el control de la proliferación celular.

Todas estas alteraciones permiten a las células cancerosas alcanzar las características que definen a un cáncer:

- Autosuficiencia en las señales de crecimiento.
- Insensibilidad a señales de parada de crecimiento.
- Evasión de apoptosis.
- Angiogénesis mantenida.
- Potencial de replicación ilimitado.
- Invasión tisular y formación de metástasis.

Así, en el caso del cáncer de pulmón, es frecuente encontrar mutaciones en el gen que codifica p53 (hasta en el 50% de carcinomas de célula no pequeña y cerca del 70% en microcíticos). Las mutaciones en este gen son más frecuentes en fumadores que en no fumadores y la frecuencia de las mutaciones se correlaciona con el número de cigarrillos fumados. La segunda alteración más frecuente es la inactivación de la ruta Rb, bien por pérdida de expresión del gen RB1, bien por inactivación de p16 o por sobreexpresión de cilina D [5, 13]. Otro de los genes más frecuentemente mutados en el cáncer de pulmón (así como en muchos otros cánceres) es el que codifica las proteínas RAS [14].

Las alteraciones en oncogenes son genéticamente dominantes, bastando una sola mutación en uno de los dos alelos presentes en las células para desatar la actividad oncogénica. El caso de las mutaciones en genes supresores tumorales es distinto, siendo su efecto recesivo y debiendo presentar los dos cromosomas una variación en el gen para que se vea comprometida la actividad supresora[15].

El cáncer de pulmón puede dividirse en dos tipos histológicos principales: cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas, siendo más frecuente este último, ya que representa cerca del 80% de casos. En este grupo se engloban tres tipos predominantes de tumores: carcinoma de células escamosas o epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma indiferenciado de células grandes.

El carcinoma epidermoide es un tumor maligno epitelial que muestra queratinización y puentes intercelulares que parten del epitelio bronquial. Cerca del 90% de los casos se producen en fumadores.

El adenocarcinoma es un tumor epitelial maligno con diferenciación glandular o producción de mucinas. En algunos países ha sobrepasado al carcinoma epidermoide en como tumor más común y aunque se presenta en la mayoría de los casos en fumadores, es también el tumor más común en el grupo de no fumadores, principalmente en mujeres.

El carcinoma de células grandes es un tumor indiferenciado que no presenta las características citológicas y de organización del carcinoma de células pequeñas y además carece de

diferenciación escamosa o glandular. Supone cerca del 9% de los cánceres de pulmón y aparece principalmente en hombres.

El cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico se caracteriza por presentar células con escaso citoplasma y bordes indefinidos, cromatina nuclear granular y nucleolo ausente o difícil de observar. Está muy ligado al consumo de tabaco[13].

## **2. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA**

Si bien el tabaco es la principal causa de cáncer de pulmón, pudiendo atribuírsele un 90% de los casos, tan sólo un 10-15% de las personas fumadoras acaban desarrollando este tipo de tumor. Esto hace suponer que debe de existir algún tipo de diferencia en el modo en que el organismo de cada individuo responde a las agresiones provocadas por los agentes tóxicos presentes en el tabaco. Estas diferencias podrían deberse, entre otras, a diferencias en el metabolismo, en la reparación del ADN, estado nutricional, expresión alterada de oncogenes y supresores de tumores alimentarias, inmunológicas, etc[16].

La diversidad genética que existe en la población es debida principalmente a la presencia en el ADN de pequeñas modificaciones en la secuencia de nucleótidos, denominadas polimorfismos. Los polimorfismos ocurren con una frecuencia estimada de 1 cada 1.000 pares de bases y cerca del 90% de los mismos corresponden a cambios en un único nucleótido o SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). En muchos casos, el significado funcional de los polimorfismos se desconoce. Dependiendo del lugar que ocupan en la secuencia del gen, los polimorfismos pueden afectar a la transcripción, translación, estabilidad del ARNm, a la actividad de la proteína o ser cambios sin efecto alguno. Si se altera la actividad proteica o la expresión de genes relacionados con el cáncer, pueden tener un valor pronóstico o incluso de desarrollo clínico[17].

Dado que la mayoría de los carcinógenos presentes en el tabaco sufren alteraciones metabólicas transformándose en metabolitos activos que forman aductos con el ADN, cabría focalizar, en el caso del cáncer de pulmón, en las posibles variaciones en los mecanismos del metabolismo de los carcinógenos, en los enzimas de detoxificación, en los mecanismos de reparación del ADN y de control del ciclo celular como posibles determinantes de la susceptibilidad individual a este tipo de cáncer[16]. Puesto que para que puedan actuar los mecanismos de reparación del ADN debe detenerse la maquinaria de proliferación celular, de entre estos mecanismos cobran especial relevancia aquellos implicados en la regulación del ciclo celular, que actúan como centinelas de la correcta replicación del ADN y de la progresión adecuada del desarrollo celular. Esta progresión depende de la activación de las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), que actúan conjuntamente formando un heterodímero en el que las ciclinas son las subunidades reguladoras y las CDKs ejercen la actividad catalítica. Si bien las CDKs se expresan durante todo

el ciclo, las ciclinas tienen períodos restringidos de expresión en determinadas fases del mismo. Todo este proceso está fuertemente regulado por las familias de inhibidores de quinasas dependientes de ciclina, por miembros de la familia del retinoblastoma y otros factores[18].

### **3. CICLO CELULAR**

El ciclo celular es el proceso por el que la célula atraviesa una serie de etapas a través de las cuales duplica su material genético, aumenta de tamaño y se divide en dos células hijas en la mitosis. En el transcurso de este ciclo, la célula se prepara para la síntesis del ADN (fase G1), replica su material genético (fase S), se prepara para la segregación de los cromosomas (fase G2) y finalmente separa los cromosomas en dos células hijas durante la mitosis. En el transcurso de este ciclo, la célula sintetiza ARN y proteínas (fase G1), replica su material genético (fase S), se prepara para la segregación de los cromosomas, fabricándose proteínas nuevas y doblándose el tamaño de la célula (fase G2) y finalmente separa los cromosomas en dos células hijas durante la mitosis.

Los complejos que intervienen en la síntesis de ADN están regulados por las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina (Cdk). Se conocen al menos ocho tipos de CDKs activas, CDK1-CDK8, y al menos 10 ciclinas diferentes son requeridas durante el ciclo para activarlas. Así, las ciclinas D, E, A y B son necesarias para la fase G1, la transición G1/S, la fase S y la transición G2/M y la mitosis, respectivamente. Mientras tanto, los complejos ciclina/CDK son todos activados por fosforilación por el complejo cdk7/ciclina H[19, 20]. Durante la transición de la fase G1 a la S, los complejos encargados de la síntesis de ADN se encuentran asociados a complejos Cdk2/ciclina A sin unirse a la cromatina. Durante la fase S, al liberarse la Cdk2, el complejo se une a la cromatina, teniendo lugar la síntesis de nuevo material genético. Durante la fase G2, Cdk1 reemplaza a Cdk2 y tanto la ciclina A como la ciclina B se asocian al complejo, inactivándolo[21].

El paso de la célula de la fase G1 a la fase S presenta un punto de restricción altamente regulado por el complejo ciclina E/Cdk2, que se cree que inicia la replicación del ADN. La transcripción de la ciclina E es activada por E2F. La proteína del retinoblastoma Rb se une a E2F formando complejos e impidiendo así el avance a la fase S. A su vez, la ciclina E es capaz de fosforilar tanto a Rb como a los complejos Rb-E2F, permitiendo la liberación del factor de transcripción para que progrese el ciclo.

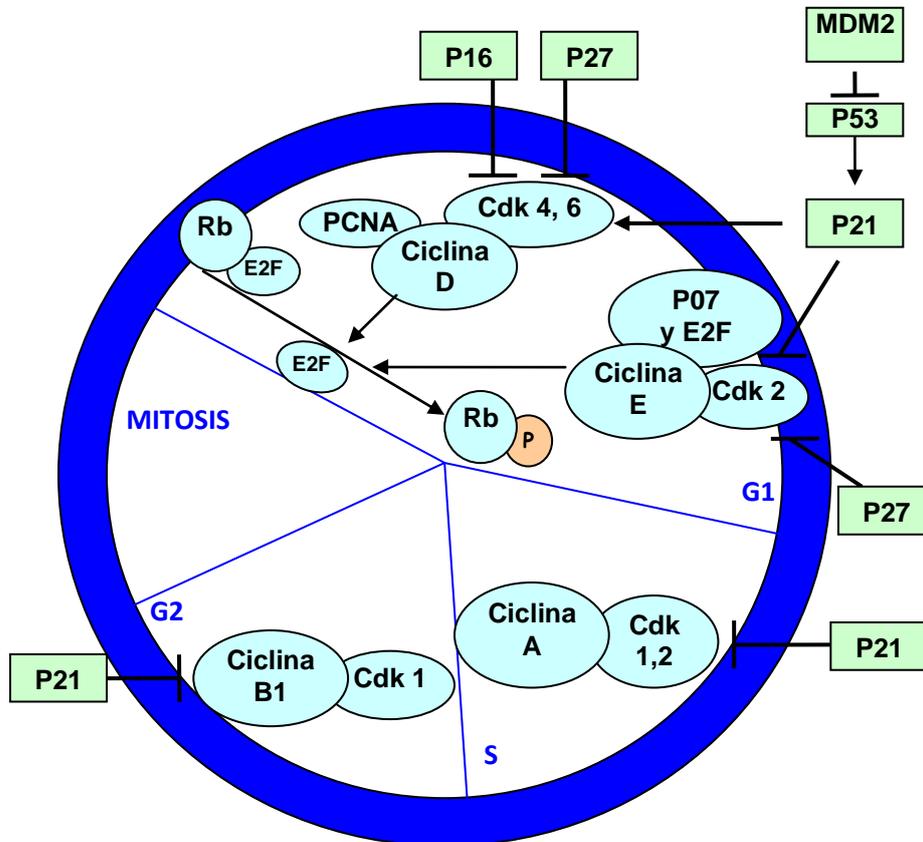
La actividad catalítica de las CDKs está sometida a un control ejercido por dos familias de moléculas. La primera familia incluye a las proteínas INK4a, que se unen exclusivamente a las quinasas CDK4-CDK6, por lo que son específicas de la fase G1 temprana. La segunda familia, las proteínas Cip/Kip, son capaces de inhibir todos los complejos ciclina-cdk y no son específicas de fase.

De entre las moléculas implicadas en el control de la transición de la célula de la fase G1 a la fase S, cabe destacar el papel de la proteína supresora de tumores p53, que ante las señales de estrés celular, actúa regulando diversos genes, entre los que se encuentra el que codifica la proteína p21, un miembro de la familia Cip/Kip que actúa inhibiendo las CDKs necesarias para la entrada en la fase S. En condiciones normales, se mantienen bajos los niveles de p53 debido a su corta vida media causada por la degradación mediada por MDM2. P53 también ejerce un control durante la fase G2 a través de p21 y otras moléculas.

Cabe mencionar otras proteínas implicadas en el control del correcto desarrollo de la proliferación celular, como p16, que tiene un papel fundamental en la transición G1/S del ciclo celular o p27, que interviene también en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo, inactivando a la ciclina E al formar complejos con ella. La ciclina E, a su vez, es capaz de fosforilar p27 y los complejos ciclina E-p27, permitiendo así la ruptura del complejo y el avance a la fase S. La proteína p27 es capaz de interactuar con p21, con efecto redundante o sinérgico[22, 18, 23].

El control del paso de la célula de la fase G1 a la S se asegura de que la célula es lo suficientemente grande para albergar la síntesis de nuevo material genético, que se ha reparado cualquier daño sufrido por el ADN y que las condiciones externas son favorables a la mitosis. El paso de la célula de la fase G2 a la M se produce si todo daño del ADN ha sido reparado y la célula tiene el tamaño suficiente para dividirse.

Figura 4. Esquema simplificado del papel que juegan los inhibidores de Cdks en el ciclo celular.



#### 4. GENES REGULADORES DEL CICLO CELULAR

##### 4.1. El gen *p21*

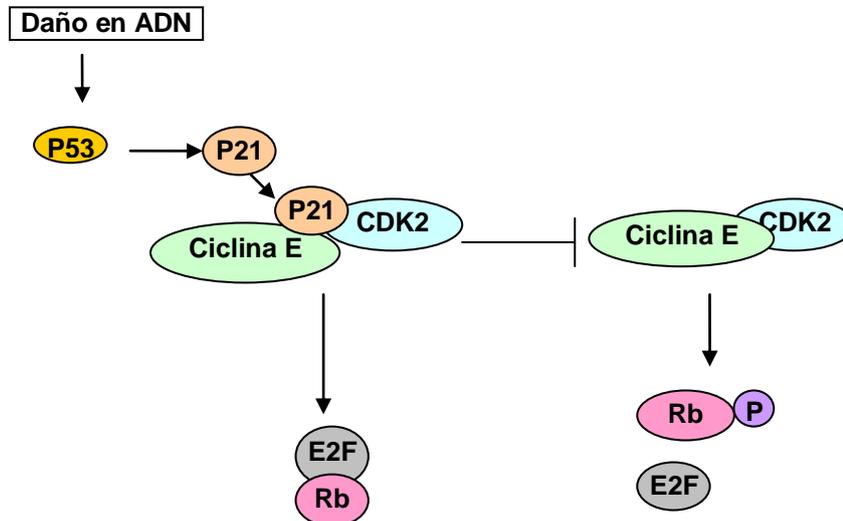
El gen *p21*, también conocido como WAF1 (wild-type p53-activated fragment 1), Cip 1 o CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A), situado en el cromosoma 6 (6p21.2), codifica un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (cdk). Presenta en su promotor dos regiones de unión a p53, estando su transcripción regulada por esta proteína y otros factores de transcripción. La proteína transcrita presenta en su región amino terminal un motivo de unión a ciclinas y otro de unión a cdk, que bloquea estéricamente el sitio de unión del ATP, evitando la actividad catalítica de las cdk. En su región carboxi terminal se encuentra el dominio que interacciona con PCNA.

**Figura 5.** Esquema de la proteína p21 mostrando los sitios de unión de ciclinas (cic), Cdk (cdk) y PCNA.



La proteína p21 se une e inhibe la actividad de complejos ciclina E-CDK2 deteniendo el progreso del ciclo durante la fase G1 e impidiendo la entrada en la fase S. A su vez, tiene la capacidad de inhibir la actividad de los grupos ciclina A-CDK2 y ciclina A-CDK1, necesarios para la progresión de la fase S y el paso a la fase G2 respectivamente. También interviene en el paso de la fase G2 a la M mediante su unión a complejos CDK1-ciclina B1. Bajo ciertas condiciones, p21 es capaz de promover la actividad quinasa de la CDK4 O CDK6 que forman complejo con la ciclina D, favoreciendo la progresión de la fase G1. La expresión de este gen está estrechamente controlada por la proteína supresora de tumores p53, a través de la cual esta proteína media la parada del ciclo dependiente de p53 en la fase G1, en respuesta a una gran variedad de estímulos estresantes[24, 25]. P21 puede interactuar con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), un factor accesorio de la ADN polimerasa, jugando un papel regulador en la replicación y en la reparación del daño del ADN durante la fase S. Esta unión a PCNA resulta en la competición con proteínas que interactúan con PCNA y su desplazamiento, inhibiendo la replicación del ADN y modulando varios procesos de reparación dependientes de PCNA. Esta interacción favorece la promoción de la diferenciación celular y la imposición de la senescencia celular[24, 26].

**Figura 6.** Parada del ciclo celular en G1 mediada por p21. Al producirse un daño en el ADN, p53 activa la transcripción de p21, que se une a los complejos ciclina E/Cdk2 inactivándolos e impidiendo la fosforilación de Rb. Al mantenerse sin fosforilar, Rb permanece unido al factor E2F, impidiendo que este actúe como factor de transcripción y se comience con la síntesis del ADN.

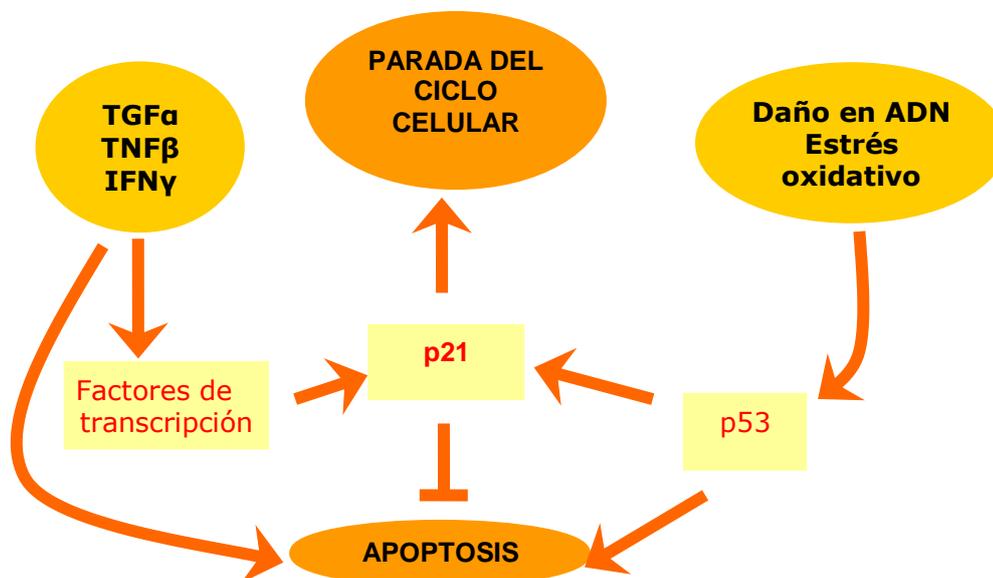


En los últimos años, se está descubriendo que además de su actividad supresora, p21 presenta funciones antiapoptóticas u oncogénicas. Estas actividades de p21 dependerían de su localización celular: en el citosol actuaría en su faceta antiapoptótica, mientras su función supresora tendría lugar en el núcleo[24,25].

Si bien p21 es una diana transcripcional directa de p53 y está fuertemente inducida por el daño en el ADN producido en células que expresan p53 wild type (wt), el aumento en los niveles de transcripción de esta proteína puede ocurrir por mecanismos independientes, existiendo diversos factores de transcripción que regulan la expresión de p21 por medio de elementos de acción cis en su promotor. Además, es efector de otros genes supresores de tumores y su expresión se eleva también en presencia de factores de crecimiento y agentes de diferenciación.

El aumento de la expresión de p21 conduce a la parada del ciclo celular en las fases G1, G2 o S, siendo su activación importante en este proceso inducido por p53. Sin embargo, p21 no desarrolla un papel fundamental en la apoptosis inducida por esta proteína. De hecho, puede bloquear el proceso apoptótico desencadenado por p53 si el daño en el ADN es pequeño y además puede desencadenar ella misma la apoptosis de una forma independiente de p53[27, 28].

**Figura 7.** Esquema del papel que juega p21 en los procesos de regulación del ciclo celular y la apoptosis.



Ciertas moléculas implicadas en la degradación de p21 están sobreexpresadas en una variedad de tumores humanos. Además, esta molécula sinergiza con otros supresores y antagoniza oncogenes, lo que hace de ella una interesante diana terapéutica y anima a su estudio en relación al cáncer [25].

Se han descrito al menos 40 polimorfismos en el gen *p21*, de los que 35 son intrónicos y sólo 7 tienen una frecuencia alélica superior al 10%. En la región no transcrita 3', aparecen al menos 4 SNPs, de los que sólo uno tiene una frecuencia mayor al 10% y consiste en una transición citosina-timina 20 nucleótidos después del codón de parada del exón 3 (*p21* C70T, dbSNP rs1059234). Este polimorfismo se asocia con un aumento del riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y actúa con el polimorfismo Ser31Arg de una manera dosis-dependiente[29]. También se asocia a un aumento del riesgo de cáncer de próstata [30].

Otro polimorfismo frecuentemente estudiado es el A149G, una transición adenina-guanina en la región de unión al PCNA [31], que resulta en un cambio de aminoácido de un aspartato por una glicina en el dominio de unión a PCNA. El alelo polimórfico aparece con más frecuencia en tumores con p53 wt [32, 31] y en un estudio realizado en la India se presenta asociación entre el alelo variante y un incremento de riesgo para cáncer oral [32].

También se ha descrito una delección en el intrón 2 del gen, cerca del extremo 5' [33, 34]. En un estudio de cáncer de mama, Staalesen y col. describen un nuevo polimorfismo, el *p21* G251A, que provoca un cambio en el codón 84 de una arginina por una glicina, asociado con el cáncer de mama localmente avanzado[35].

El polimorfismo del gen *p21* más estudiado se localiza en el codón 31, en el que una transversión de una citosina (AGC) por una adenina (AGA) provoca un cambio de aminoácido en la proteína que codifica, pasando de una serina (Ser) a una arginina (Arg) (*p21* Ser31Arg; *p21* C98A, dbSNP rs 1801270).

En la literatura aparecen resultados contradictorios a la hora de relacionar este polimorfismo y el cáncer. Así, en un estudio de 2005, Li y col. muestran que el alelo Arg incrementa el riesgo de padecer carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [29]. En el estudio en cáncer de mama descrito por Powell y col. en 2002, también aparece un aumento de riesgo en los portadores del alelo Arg, relacionado con receptor de progesterona negativo. En ese mismo estudio, no se encuentra una relación entre el polimorfismo y la supervivencia a la enfermedad [34]. Por otra parte, otro estudio señala la falta de asociación entre el polimorfismo y el riesgo de cáncer gástrico en una población taiwanesa [36]. Por otro lado, en un estudio en una población coreana, se observa que el alelo Ser incrementa el riesgo de adenocarcinoma cervical [37]. En el caso del cáncer de pulmón, los resultados son también contradictorios. Mientras en unos el alelo Arg se relaciona con un incremento del riesgo de padecer cáncer de pulmón, con una OR= 5,2 (IC 95%, 5,2-18,1) [38], en otros no aparece una relación estadísticamente significativa en población caucásica OR= 1,34 (IC 95%, 0,7-2,5) [39].

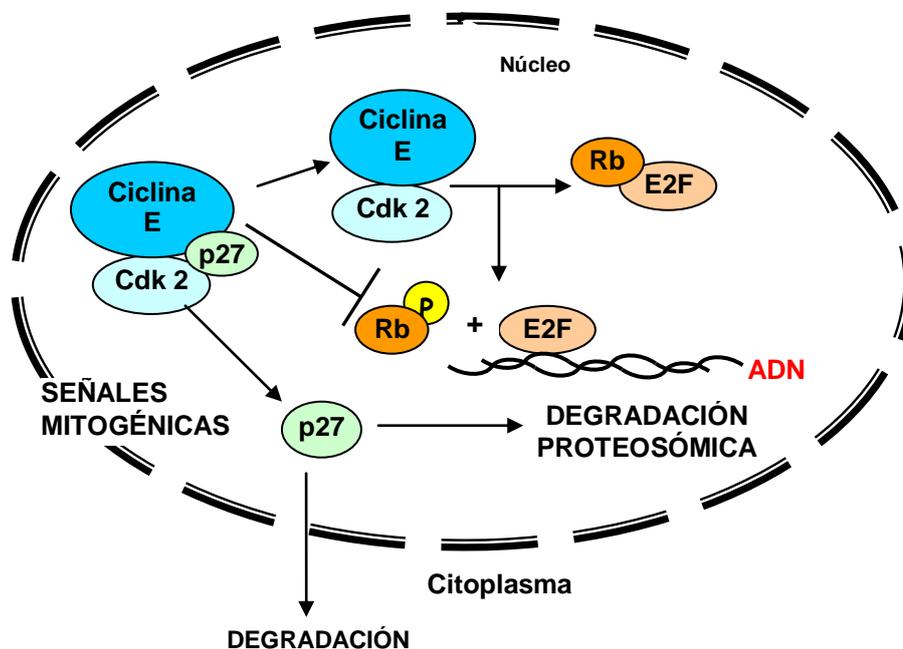
Puesto que *p21* es un factor muy relacionado con la regulación del ciclo celular y es responsable de la detención del ciclo en fase S para la reparación de posibles daños en el ADN, siendo uno de los efectores de *p53*, los polimorfismos que alteran la composición de aminoácidos de la proteína que codifica podrían tener algún efecto en la función de la proteína que aumente o disminuya su eficacia. En el caso del polimorfismo Ser31Arg en el gen *p21*, dado que se encuentra en una región altamente conservada que incluye el dedo de zinc, es de suponer que la función de la proteína se vea alterada. Así, al alterar la parada del ciclo inducida por *p21*, la reparación del ADN dañado podría verse comprometida y aumentar así la aparición de mutaciones que den origen a tumores.

#### **4.2. El gen *CDKN1B* (*p27*)**

El gen *CDKN1B* se sitúa en el cromosoma 12p13 y codifica una proteína reguladora que controla la progresión a través del ciclo celular interactuando con varios complejos ciclina/cdk. Al igual que *p21*, la proteína codificada presenta una región amino-terminal con capacidad de inhibir la actividad quinasa de los complejos ciclina-CDK y que presenta también un sitio de unión a ciclina, pudiendo unirse a cada subunidad por separado o al complejo, siendo esta última una unión más estrecha. En su extremo carboxi-terminal parece interactuar con proteínas no relacionadas con el desarrollo del ciclo celular [40].

Al unirse a los complejos ciclina E/cdk 2, p27 inhibe la fosforilación de la proteína Rb, propiciando así la no incursión de la célula en la fase S. Además, cuando se localiza en el citoplasma, actúa como factor de ensamblaje del complejo ciclina D/cdk 4,6, lo que favorece la proliferación celular. Por otro lado, tiene funciones independientes del ciclo celular, como los papeles que juega en la movilidad celular, por su interacción con Rho A en el citoplasma inhibiendo su función, o en la apoptosis si bien los mecanismos exactos por los que actúa aún no se han comprendido del todo. Esta proteína también juega un papel importante en la diferenciación celular.

Figura 8. Papel que juega p27 durante el ciclo celular



Existen numerosos inhibidores de crecimiento que inducen la expresión de p27. Así, en células quiescentes, hay gran expresión de p27 en el núcleo, manteniendo a las células en fase G0. Al responder a señales mitogénicas, la célula entra en fase G1, momento en el que p27 interactúa con los complejos ciclina D/cdk 4, 6 favoreciendo su ensamblaje y tiene la función de inhibir los complejos ciclina E/cdk2. Al final de la fase G1, los niveles de p27 disminuyen, puesta en marcha la actividad de los complejos ciclina E/cdk 2. Durante todos estos procesos, la estabilidad de p27, su localización celular (nuclear o citoplásmica) y su degradación están reguladas por fosforilaciones en diversos puntos de la proteína.

A diferencia de otros supresores de tumores, p27 no suele encontrarse mutado o silenciado epigenéticamente, sino que su inactivación se debe a eventos postraslacionales que conducen a su regulación a la baja, su exclusión del núcleo o a su secuestro en complejos ciclina/cdk. En la mayoría de tumores humanos, la pérdida de p27 se debe a la alteración de su degradación proteosómica. Por otro lado, se ha observado que además de sus funciones antitumorales, p27 presenta también funciones prooncogénicas cuando se localiza en el citoplasma, aumentando la movilidad celular y asistiendo a la unión ciclina D/cdk4, lo que favorece la metástasis y la progresión en el ciclo celular [41-43].

Bajos niveles de proteína p27 han sido asociados con tumorigénesis y un peor pronóstico en los casos de cáncer. Se conocen 21 SNP en el gen CDKN1B, de los cuales 11 tienen una frecuencia alélica muy baja (5%) y 9 se producen en regiones no codificantes del gen. Existe en la posición 326 una transversión T/G que provoca una sustitución en el codón 109 de la proteína de una glicina por una valina que parece reducir la traslocación citosólica de p27, incrementando su estabilidad nuclear y disminuyendo su degradación[44].

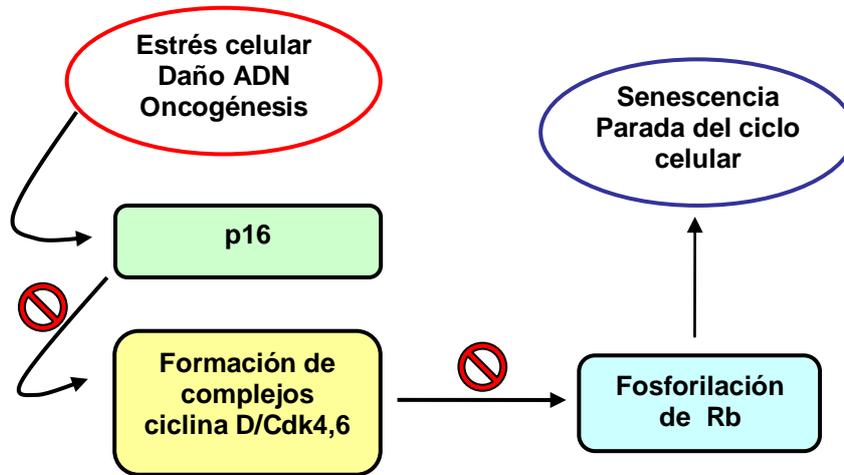
#### **4.3. El gen CDKN2 (p16)**

El gen CDKN2 se sitúa en el cromosoma 9p21, está formado por tres exones y codifica la proteína de 156 aminoácidos p16, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclina perteneciente a la familia INK4, que inhibe la actividad de las quinasas CDK4 y CDK6 durante la fase G1 del ciclo celular.

Al igual que el resto de proteínas pertenecientes a la familia INK4, p16 se une a las quinasas CDK4 o 6, impidiendo la formación de complejos con la ciclina D. No solo puede evitar la formación de estos complejos sino también separarlos. El lugar de unión de estas proteínas está situado junto al sitio de anclaje del ATP en el dominio catalítico de la quinasa, opuesto al sitio de unión de la ciclina D, por lo que provoca un cambio de conformación que altera alostéricamente el sitio de unión de la ciclina, imposibilitando su unión. La inhibición de la formación de complejos ciclina D1-CDK 4/6 impide la fosforilación de la proteína Rb y la liberación del factor E2F, lo que conlleva la detención del ciclo en la transición G1/S[45, 46].

La expresión de p16 en respuesta a diversos estímulos estresantes tales como la activación oncogénica, la erosión telomérica, las especies reactivas de oxígeno, el atasco de las horquillas de replicación, etc conduce a una disrupción del ciclo y la entrada de las células en un estado de senescencia. Para el desarrollo del cáncer, revertir el estado de senescencia impuesto por p16 es un evento crucial, por lo que la actividad de esta proteína se ve interrumpida en numerosos tumores, bien por mutación, bien por silenciamiento epigenético.

**Figura 9.** Esquema del papel que juega p16 en la detención del ciclo celular



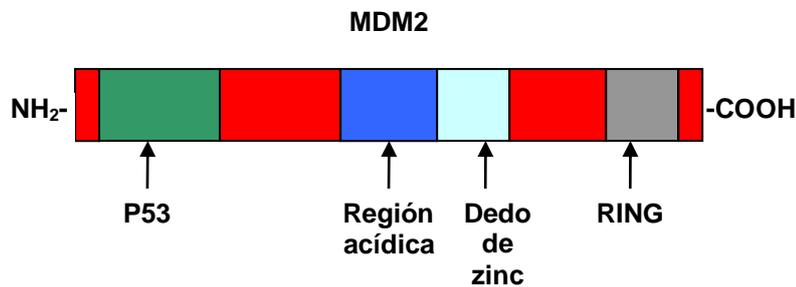
Además de su papel antitumoral, p16 va acumulándose con la edad, así como la presencia de células senescentes, lo que va asociado a un descenso de la capacidad de replicación de distintos tejidos [47-49].

El gen p16 es polimórfico, presentando los polimorfismos C580T y C540G que se sitúan en la región 3'UTR del exón 3. Se ha relacionado la presencia del polimorfismo C540G con una baja expresión de p53, y ambos se han relacionado con una mayor agresividad tumoral. Pese a esto, su relación con el riesgo de padecer cáncer es contradictoria, al haberse relacionado con un mayor riesgo de cáncer cervical, pero no haberse encontrado relación en tumores como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello[45, 50].

#### 4.4. El gen *MDM2*

El gen *MDM2* consta de 12 exones que generan proteínas de diferentes tamaños. Presenta dos promotores, de los cuales P1 controla la expresión basal y P2 presenta elementos de respuesta a p53 y es responsable de la expresión inducible del gen. Los 100 aminoácidos terminales de *MDM2* constituyen el dominio de interacción con p53, uniéndose esta región con el dominio de transactivación aminoterminal de p53. Además, cuenta con una señal de localización nuclear y otra de exportación. Su dominio ácido central es necesario para su relación con la proteína ribosomal L5 y con p300/CBP. Al lado del dedo de zinc se encuentra el dominio RING común a las ubiquitin ligasas E3 y que sirve también de unión con *MDMX*, una proteína homóloga necesaria para el correcto funcionamiento *MDM2*.

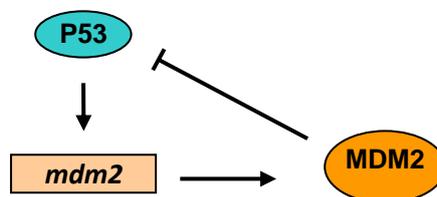
Figura 10. Estructura de la proteína MDM2.



La proteína MDM2 actúa como una ubiquitin ligasa E3, marcando a p53 para su eliminación por el proteosoma 26S llevando a cabo una ubiquitinación monomérica en múltiples residuos de lisina de p53. La monoubiquitinación de moléculas está relacionada con la endocitosis, la transcripción, la reparación del ADN y el reclutamiento de caspasas en la apoptosis. Puesto que para la degradación proteosomal eficiente de una molécula son necesarias cadenas de al menos 4 ubiquitinas, en la marcación de p53 para su eliminación deben actuar otras moléculas además de MDM2. Además de mediante su degradación, MDM2 es capaz de modular la actividad transcripcional de p53, gracias a que se une a su región aminoterminal.

Al unirse al promotor P2 de *mdm2*, P53 regula al alza la expresión de MDM2. Puesto que MDM2 inhibe la actividad de p53, se forma un bucle de retroalimentación negativo que regula finamente la función de p53. A su vez, niveles bajos de p53 resultan en un descenso de la cantidad de MDM2 a niveles constitutivos. Por otro lado, MDM2 es capaz de autoubiquitinizarse e inducir su propia degradación, lo que constituye otro mecanismo de regulación de esta vía [51, 52].

Figura 11. Bucle de retroalimentación negativa entre Mdm2 y p53.



Se ha encontrado que MDM 2 está sobreexpresado en numerosos tumores humanos en los que p53 no está mutado, actuando como oncoproteína. Sin embargo, el hecho de que tanto la proteína MDM2 como la proteína p53 sufran alteraciones en respuesta a daños en el ADN que derivan en la interrupción de su interacción dificulta suponer que esta actividad oncogénica se deba a la

inhibición de la actividad transcripcional de p53. Quizás esa sobreexpresión de MDM2 suponga una saturación de las cascadas modificadoras de proteínas. Por otro lado, algunos estudios muestran una actividad supresora de Mdm2 al detener el ciclo celular en la fase G1 en células normales, si bien se ha observado que en células tumorales esta parada del ciclo propiciada por MDM2 es mucho menor [52, 53].

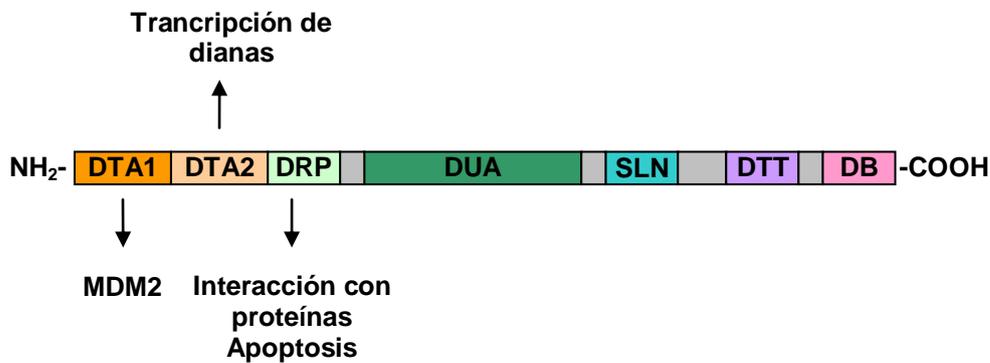
Se han encontrado varios SNPs en el gen MDM2, entre ellos el T309G (rs2279744), el G285C (rs117039649) y el T344A (rs1196333). El más estudiado de ellos, el T309G aumenta la afinidad del activador transcripcional Sp1, lo que resulta en la presencia de niveles más altos de proteína, lo que conduce a una atenuación de la respuesta de p53 a estímulos estresantes de la célula, convirtiéndolo así en objeto de estudio de la susceptibilidad frente a los tumores. El G285C, por el contrario, parece reducir la afinidad de la unión de Sp1, y se ha asociado con una reducción del riesgo para cánceres de mama, ovario, y endometrio. Este polimorfismo se ha encontrado en población caucásica. Pese a que el polimorfismo T344A afecta a la unión de distintos factores de transcripción, no se ha encontrado efecto en los niveles de transcripción de MDM2 [54].

#### **4.5. El gen p53**

El gen p53 fue primeramente considerado como un oncogen, dado que aparecía sobreexpresado en numerosas líneas celulares cancerosas. Con el transcurso de los años y el avance de las investigaciones se vio que p53 en realidad era un supresor de tumores, y lo que se había tenido por oncogen no eran más que versiones mutadas del mismo. Consta de 20 exones, abarca 20 kilobases y se localiza en el cromosoma 17p13.1, transcribe un factor de transcripción multifuncional que se ha erigido como el principal supresor tumoral. Aunque no es necesario para el crecimiento y el desarrollo normal, juega un papel crucial en la prevención del desarrollo tumoral.

La proteína está formada por 393 aminoácidos y presenta dos dominios de activación transcripcional en su extremo amino terminal, región en la que se encuentra el sitio de unión de MDM2, el regulador negativo de p53; un dominio de unión al ADN, situado en la región central de la proteína, que reconoce secuencias específicas de sus genes diana; una región rica en prolina, fundamental para su interacción con otras proteínas y la regulación de la apoptosis; y un dominio carboxi terminal de tetramerización [55-59].

**Figura 12.** Estructura de la proteína p53. DTA 1 y DTA 2 son los dominios de transactivación; DRP el dominio rico en prolina; DUA, el dominio de unión al ADN; SLN la señal de localización nuclear; DTT el dominio de tetramerización y DB el dominio básico del extremo carboxi-terminal. Se indican también algunas interacciones de los dominios señalados con ciertas moléculas.

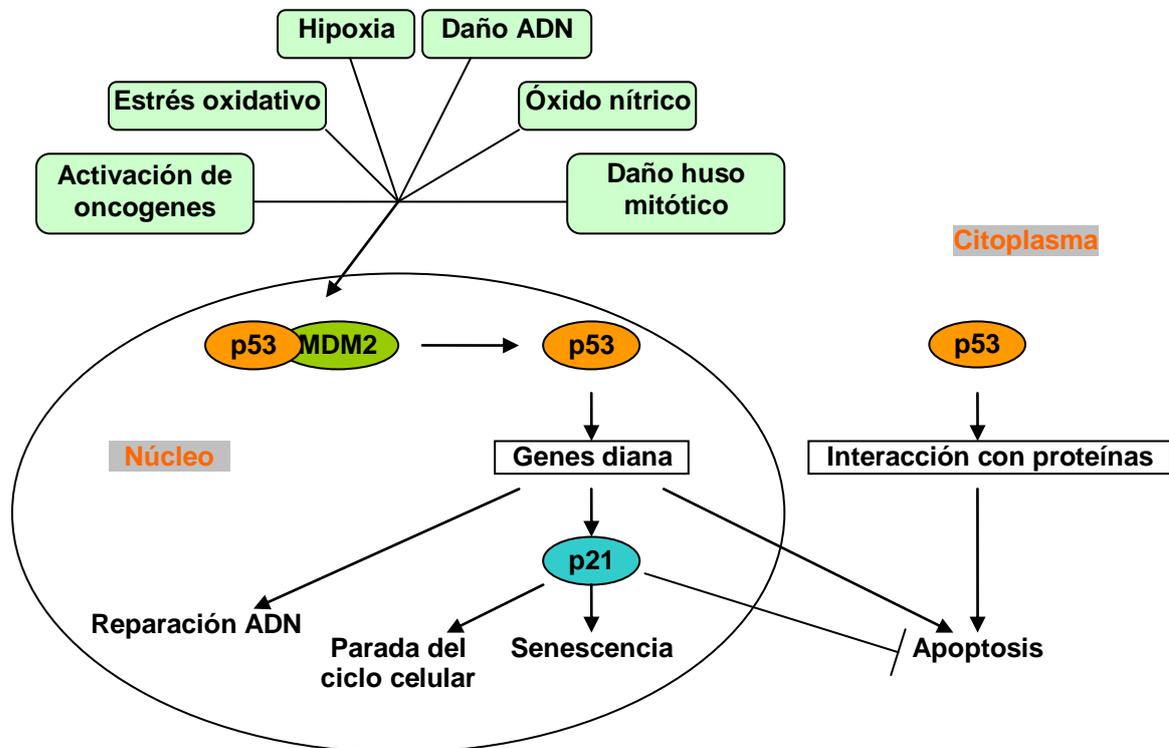


El gen p53 aparece mutado en cerca del 50% de los tumores, lo que lo convierte en un punto fundamental en el estudio del cáncer. En condiciones normales, la proteína p53 actúa induciendo la parada del ciclo celular, llevando a la célula a la apoptosis o estableciendo un estado de senescencia. Todos estos procesos conducen o bien a la reparación de posibles daños en el material genético de la célula o a la desaparición de células tumorales o genéticamente dañadas. Los ratones deficientes en la expresión de p53 presentan fenotipos proclives al desarrollo de tumores. Se ha observado también que incluso los tumores en los que no está mutado p53 presentan defectos en la habilidad de inducir la respuesta mediada por p53.

Dadas sus capacidades inhibitorias del ciclo celular, la actividad de p53 se encuentra estrechamente controlada. En situaciones de normalidad celular, p53 tiene una vida media corta y sus niveles se mantienen bajos por la represión que sobre ella ejerce MDM2. p53 se activa ante diversas señales de estrés tales como activación oncogénica, daño en el ADN, radiación, hipoxia, etc. En respuesta a estas señales, p53 sufre cambios postranscripcionales que conducen a su acumulación en el núcleo. Este tipo de regulación permite una rápida activación de p53 en respuesta al estrés celular [59]. En función de las señales que desaten la vía, de la célula en la que se produzcan y de la intensidad de las mismas, se activan diferentes mecanismos regulados por p53. Uno de los principales efectores de p53 es p21, que media el arresto del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN, favoreciendo la reparación del material genético aberrante e impidiendo la apoptosis [28]. Por otro lado, p53 es capaz de interactuar con moléculas de las vías de mTOR y PI3K, regulando los procesos autofágicos de la célula. También es capaz de aumentar la transcripción de factores proapoptóticos de la familia BCL-2, de componentes esenciales de la maquinaria apoptótica (como por ejemplo ciertas caspasas) y de elementos de la vía de los

receptores de muerte. Cuando se localiza en el citoplasma, se ha visto que p53 es capaz de actuar con proteínas en el citoplasma, como los efectores proapoptóticos BAK y BAX[55, 60].

Figura 13. Algunas de las principales vías de acción de p53 en el núcleo y en el citoplasma.



Se han descrito al menos 13 variantes polimórficas de p53, de las que ocho se localizan en intrones y cinco en exones. Las cinco variaciones que se encuentran en zonas exónicas son una transición C-T en el codón 21, otra G-A en el 36, una C-T en el codón 47 y otra transición A-G en el 213, además de una transversión G-C en el codón 72. De entre ellas, una de las más estudiadas es la transversión guanina-citosina en el codón 72 del exón 4, que conduce a un cambio de arginina a prolina[61-63]. Se ha observado que la variante prolina tiene una mayor capacidad transcripcional que la variante arginina, mientras que la variante ARG parece tener una mayor actividad a la hora de inducir apoptosis gracias a que es más eficiente su translocación a la mitocondria[64, 65]. También se ha visto que la variante prolina es más eficiente a la hora de reparar el DNA que la variante Arg, debido a su mayor capacidad de inducir genes diana de la la Reparación de ADN dependientes de p53[66].

Existen numerosos estudios que buscan una relación entre este polimorfismo p53 Arg72Pro y diversos tipos de tumores como el cáncer de pulmón. En un metanálisis llevado a cabo en 2009, incluyendo 32 estudios se concluye que el alelo Pro es un factor de riesgo en el desarrollo del

cáncer de pulmón. Además, en un estudio previo de nuestro grupo de investigación, se obtuvo un aumento de riesgo a padecer cáncer de pulmón en los portadores del alelo Pro (OR=1.32; IC95%=1.03-1.69)[67, 68].

## **OBJETIVOS**

Los objetivos concretos de este estudio fueron:

-Establecer los genotipos de los individuos participantes en el estudio CAPUA para seis polimorfismos presentes en cinco genes que intervienen en la regulación del ciclo celular.

-Analizar la relación de estos polimorfismos y el riesgo a padecer cáncer de pulmón en la población asturiana.

-Observar el efecto conjunto de tres parejas de genes cuyas funciones están estrechamente relacionadas y el riesgo de cáncer de pulmón.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## 1. MATERIAL

### 1.1. Enzimas y reactivos de Biología Molecular

Los oligonucleótidos empleados en la amplificación de los fragmentos de ADN fueron sintetizados por Sigma-Aldrich y el enzima Taq Polimerasa fue adquirida en Biotools. Por su parte, el enzima de restricción *BlnI*, que se empleó en la determinación del polimorfismo Ser31Arg presente en el gen *p21*, fue proporcionado por Izasa. Finalmente, la agarosa D-1 de grado Biología Molecular, utilizada para la elaboración de los geles necesarios para la electroforesis, fue adquirida en Conda, mientras que los marcadores que permitieron determinar el tamaño de los fragmentos de ADN fueron suministrados por Fermentas.

Las diferentes disoluciones utilizadas para la obtención de ADN genómico y la separación de los fragmentos en geles de agarosa se prepararon mediante protocolos estándares de un laboratorio de Biología Molecular (Sambrook y col., 1989)[69]. Se preparó una solución de lisis de eritrocitos (RBC:  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  1 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  114 mM) y otra de lisis de leucocitos (WCLB: Tris/HCl 1 mM pH 7,5, NaCl 5 mM, EDTA 1 mM) para la obtención del ADN genómico a partir de las células sanguíneas. Tanto estos reactivos como el resto empleados en este trabajo fueron de grado analítico y se adquirieron en diversas firmas suministradoras: Merck, Sigma, Scharlau, Roche y Applichem.

### 1.2. Muestras Biológicas

**Sangre.** Se recogieron entre 20-30 ml de sangre de cada participante en tubos Vacutainer que contenían EDTA como anticoagulante. En todos los casos la recogida de sangre se realizó antes de iniciar el tratamiento terapéutico. Las muestras de sangre se recibieron en el laboratorio en las 5 horas posteriores a la extracción y fueron procesadas para separar el plasma de las células sanguíneas. El plasma se congeló a  $-80^\circ\text{C}$  para futuros análisis, mientras que a partir de las células sanguíneas se extrajo el ADN genómico de cada participante en el estudio.

**Enjuague bucal.** Se recogió una muestra de aproximadamente 10 ml de cada paciente, se centrifugó durante 15 min a  $3.061\times g$  y posteriormente fue almacenada a  $-80^\circ\text{C}$  para la posterior purificación del ADN genómico.

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 de 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 tuviera constancia de si la muestra a analizar pertenecía a un

caso o a un control hasta la finalización del estudio, garantizándose así la total independencia de los resultados.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1. Diseño del estudio**

Este estudio se encuentra englobado dentro de otro más amplio, denominado CAPUA (Cáncer de pulmón en Asturias), en marcha en la Unidad de Epidemiología Molecular del Cáncer del IUOPA desde el año 2000 y que analiza diversos aspectos de la susceptibilidad genética y factores de riesgo ambientales, ocupacionales y de estilos de vida, en relación con el desarrollo y/o supervivencia al cáncer de pulmón. ([www.uniovi.es/Oncologia/grupos/iii/grupoiii.htm](http://www.uniovi.es/Oncologia/grupos/iii/grupoiii.htm)).

#### **2.1.1. Sujetos de estudio**

Los individuos participantes en el estudio, tanto casos como controles, fueron seleccionados entre pacientes residentes, durante al menos los últimos seis meses, en las áreas de influencia de los hospitales de Avilés (Hospital San Agustín), Gijón (Hospital de Cabueñes) y Mieres (Hospital Álvarez Buylla).

Los casos son individuos de entre 30 y 85 años, diagnosticados por primera vez de cáncer de pulmón e identificados durante el proceso diagnóstico en los servicios de Neumología, Medicina Interna, Anatomía Patológica y Oncología de los hospitales anteriormente mencionados. El contacto con los pacientes y su inclusión como participantes en el estudio se realizó durante su primera estancia hospitalaria. El diagnóstico definitivo del nuevo caso viene confirmado con posterioridad gracias a la información anatomopatológica; en caso de que no existiese dicha información, la inclusión o no en el estudio se realiza a través de un método de consenso con los especialistas participantes.

La exhaustividad del proceso de identificación y selección de los casos incidentes de cáncer de pulmón durante el periodo de estudio, se verificó mediante la revisión periódica de los registros de Anatomía Patológica de los hospitales participantes.

Los controles son pacientes que ingresan en el mismo hospital que cada caso para cirugía dentro de un amplio espectro de condiciones agudas no relacionadas con ningún factor de riesgo conocido de cáncer de pulmón. Estos son apareados con los casos por edad ( $\pm 5$  años), género, hospital y residencia durante al menos los seis últimos meses en el área sanitaria de referencia del hospital donde se diagnosticó el caso. En el Anexo I se adjunta la lista de patologías válidas para controles en nuestro estudio CAPUA, con los Códigos de la Clasificación Internacional de Enfermedades, 9ª revisión (WHO. ICD-9).

### 2.1.2. Datos sociodemográficos y factores de riesgo

La recogida de datos fue llevada a cabo por un entrevistador, previamente entrenado, a través de una entrevista personal, tras solicitar consentimiento informado a cada caso y control, siemprefeferentemente durante su primera visita hospitalaria de diagnóstico. Dicha entrevista consiste en un cuestionario estructurado e informatizado previamente autorizado por el comité ético de cada hospital (Anexo II) en el que se recogen distintos datos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Datos recogidos en el cuestionario

❖ DATOS SOCIODEMOGRÁFICOS BÁSICOS
❖ ANTECEDENTES FAMILIARES Y PATOLÓGICOS DE CÁNCER
❖ POSIBLES FACTORES DE RIESGO DE CÁNCER
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factores Endógenos</li> </ul>
Edad
Género
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factores medioambientales</li> </ul>
Vivienda urbana o rural
Localización de la vivienda
Tipo de abastecimiento de agua
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estilos de vida</li> </ul>
Educación
Clase social
Tabaquismo activo e involuntario
Cuestionario de dieta
Prácticas de cocina y alimentación
Actividad física en tiempo libre
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Factores ocupacionales</li> </ul>
Profesión
Vida laboral
Historia de exposición ocupacional

### **2.1.3. Datos clínicos**

La recogida de datos clínicos fue llevada a cabo por los neumólogos participantes en el estudio, a los cuales se les sometió a un entrenamiento previo para asegurar la comparabilidad de criterios. Se recogió información en un impreso estructurado, diseñado específicamente para este estudio (Anexo III, IDC), sobre los síntomas, métodos diagnósticos, estadio tumoral, tipo histológico y grado de diferenciación del tumor. Además, se recabó información sobre la presencia y/o posible tratamiento de otras patologías concurrentes. Así mismo, se diseñó un impreso de seguimiento para los casos, que permitió conocer la posible evolución o remisión de la enfermedad, así como el tiempo de supervivencia.

### **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.

Para el análisis estadístico se usan los métodos estadísticos estándares del estudio caso-control. En primer lugar se comprueba que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y se describen los individuos en estudio empleando test  $\chi^2$  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 usan 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 utilizan los tests no paramétricos de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis según corresponda.

Una vez explorados los datos, para el análisis multivariante se emplea el método de regresión logística no condicionada [70]. De esta manera se hallan las estimaciones de los parámetros que permiten construir el modelo matemático que mejor explica la variable enfermedad en estudio en función de los datos de que se dispone. Posteriormente, se utilizan los tests LR y Wald para estudiar las variables que entran o salen del modelo, valorando confusión y estudiando si existe interacción entre distintos factores. También se calculan las estimaciones puntuales e intervalos de confianza de las ORs para las distintas variables de interés, teniendo en cuenta los ajustes oportunos y se estudia -a través del 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.

## **2.3. Biología Molecular**

### **2.3.1. Extracción de ADN genómico**

El proceso de extracción de ADN genómico a partir de una muestra de sangre se realiza mediante técnicas estándar de un laboratorio de Biología Molecular[69]. Primeramente, se aíslan las células sanguíneas de la muestra de sangre mediante centrifugación a 2,465xg durante 10min. Posteriormente, se someten las células aisladas a un proceso de lisis de los eritrocitos, para lo cual se resuspenden en una solución de RBC (NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 1 mM, NH<sub>4</sub>Cl 114 mM). A continuación se incuban en hielo durante 20 min y se centrifugan a 2,465xg durante 10 min eliminando finalmente el sobrenadante. Este paso se repite dos veces, obteniendo un precipitado formado por leucocitos, que se resuspende en 10 ml de solución de lisis de leucocitos WCLB (Tris/HCl 1 mM pH 7,5, NaCl 5 mM, EDTA 1 mM), 1ml de SDS al 10% y 50 µl de proteinasa K (15,6 mg/ml). Esta mezcla se incubaba a 55°C durante 16 horas. A la mezcla de lisis se le añaden 4 ml de NaCl 6 M, se agita energicamente durante 15 s, y se centrifuga 15 min a 2,465xg para precipitar las proteínas. El sobrenadante se transfiere entonces a un tubo de 50 ml con dos volúmenes de etanol absoluto (20 ml), con lo que se precipita el ADN genómico. Este se recoge en un tubo de 1,5 ml y se lava con etanol al 70% durante 15 min. Posteriormente se elimina el etanol y se deja secar. Finalmente, el ADN genómico se resuspende en agua mili-Q a una concentración final de 0,2 µg/µl y se almacena a -20° C. Durante todo el proceso de aislamiento de ADN se trabaja con puntas con filtro y se toman todas las medidas posibles para evitar posibles contaminaciones de las muestras que puedan afectar al estudio.

Para el aislamiento del ADN genómico a partir de las células de descamación procedentes de los enjuagues bucales, se utiliza el mismo protocolo que para la extracción del ADN procedente de las células sanguíneas, aunque se modifican los volúmenes para ajustarlos a la cantidad de WCLB inicial en que se resuspende la muestra (1 ml de solución WCLB).

En ambos casos, la concentración final de ADN se determina mediante la medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro UV-160 (Shimadzu).

### **2.3.2. Determinación del polimorfismo p21Ser31Arg**

Las regiones de ADN genómico que contienen el polimorfismo Ser31Arg en el gen *p21* son amplificadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La secuencia de oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación de este polimorfismo se diseña con ayuda del programa Primer3 obteniendo como oligonucleótido directo -CCCGGCCAGGTAACATAGTG- y reverso -AACTCGAAGTTCCATCGCTC-. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realiza en un volumen total de 10 µl conteniendo 20 ng de

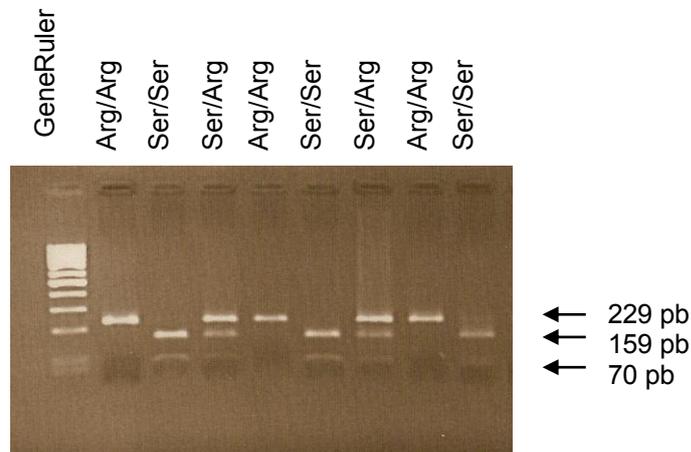
ADN genómico, 10 pmoles de cada oligonucleótido, 0,25 mM de dNTPs y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa en tampón de PCR (1x) de Biotools. El procedimiento de la PCR consiste en una primera desnaturalización a 94° C durante 5 min común para todas las amplificaciones, posteriormente se realizan 30 ciclos consistentes en: desnaturalización a 94°C durante 30 s, un proceso de anillamiento durante 30 s a una temperatura específica de 62°C y una extensión del fragmento durante 30 s a 72°C. Por último, se incuba a 72°C durante 7 minutos.

El polimorfismo en el gen *p21* estudiado en este trabajo es analizado mediante la técnica RFLP (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción). Así, una vez concluida la amplificación, se toman 5 µl del producto de PCR y se digieren, durante toda la noche a 37° C, con 2 unidades del enzima correspondiente. El enzima de restricción (*BlnI*) necesario para revelar este polimorfismo se elige mediante el programa NEBcutter V2.0 de New England Biolabs.

El producto de la digestión se analiza mediante electroforesis en un gel de agarosa/TBE. Para ello se toman 10 µl de la muestra digerida, que son mezclados con tampón de carga (1X: Tris/HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM, Glicerol 5% y azul de bromofenol 0,025%) y se carga en un gel de agarosa/TBE al 1,5%.

El polimorfismo Ser31Arg consiste en una transversión de una adenina por una citosina en la posición 6829 del gen *p21*. Esta transversión provoca un cambio de aminoácido en la proteína resultante de una serina (AGC) por una arginina (AGA). El enzima *BlnI* tiene un sitio de reconocimiento en presencia de la citosina (GCTGAGC), que se pierde cuando la posición es ocupada por la adenina.

Al digerir la muestra amplificada con el enzima *BlnI*, el genotipo homocigoto salvaje Ser/Ser aparece fragmentado en dos bandas de 159 y 70 bp, mientras que el genotipo homocigoto variante Arg/Arg sólo presenta una banda de 229 bp. El genotipo heterocigoto aparece representado, por tanto, por tres bandas, de 229, 159 y 70 bp (Figura 14).

**Figura 14:** Genotipos del polimorfismo p21 Ser31Arg en gel de agarosa al

1,5

### 2.3.3. Determinación del polimorfismo p53 Arg72Pro

Las regiones de ADN genómico que contienen el polimorfismo Arg72Pro en el gen *p53* son amplificadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que se lleva a cabo en un volumen total de 10 µl conteniendo 20 ng de ADN genómico, 10 pmoles de cada oligonucleótido (directo -TGGATGATTTTGGATGCTGTCCCC- y reverso -GAATGCAAGAAGCCCAGACGG), 0,25 mM de dNTPs y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa en tampón de PCR (1x) de Biotools. El procedimiento de la PCR consiste en una primera desnaturalización a 94° C durante 5 min común para todas las amplificaciones, posteriormente se realizan 30 ciclos consistentes en: desnaturalización a 94°C durante 30 s, un proceso de anillamiento durante 30 s a una temperatura específica de 62°C y una extensión del fragmento durante 30 s a 72°C. Por último, se incubaba a 72°C durante 7 minutos.

Una vez concluida la amplificación, se toman 5 µl del producto de PCR y se digieren, durante toda la noche a 37° C, con 2 unidades del enzima *Bst*U1.

El producto de la digestión se analiza mediante electroforesis en un gel de agarosa/TBE. Para ello se toman 10 µl de la muestra digerida, que son mezclados con tampón de carga (1X: Tris/HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM, Glicerol 5% y azul de bromofenol 0,025%) y se carga en un gel de agarosa/TBE al 2,5%.

### 2.3.4. Determinación de los polimorfismos p27 V109G, p16 C540G y G580A y MDM2 SNP309

El genotipado de los polimorfismos V109G de p27, C540G G580A de p16 y 309 de MDM2 se llevó a cabo usando el MassARRAY SNP genotyping system (Sequenom Inc., San Diego, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los principios de este método se detallan en Oeth et al., 2005[71].

Brevemente, se realiza una amplificación por PCR, añadiendo a 1µl de muestra de ADN la mezcla que se detalla en la tabla 4.

**Tabla 4.** Mezcla de la PCR

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración en 5 µl</b>	<b>Volumen (1rxn)</b>	<b>Volumen (384rxns)*</b>
H <sub>2</sub> O (grado HPLC)	NA	1,850 µl	980,38 µl
Tampón PCR (10x)	1,25x	0,625 µl	331,3 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)**	1,625 mM	0,325 µl	172,3 µl
dNTP mix (25mM cada uno)***	500 µlM	0,100 µl	53,0 µl
Primer mix (500nM cada uno)	100nM	1,000 µl	530,0 µl
Hotstar Taq® (5U/ µl)	0,5 U/rxn	0,100 µl	53,0 µl
	<b>Volumen total</b>	<b>4,000 µl</b>	<b>2120 µl</b>

\*Los volúmenes incluyen un exceso del 38%

\*\*La concentración final de MgCl<sub>2</sub> es 3,25 mM, porque el buffer contiene 1,875 mM

\*\*\*No más de 5 ciclos de congelación- descongelación.

Una vez hecha la mezcla, se lleva a cabo una PCR en las siguientes condiciones:

- ❖ Desnaturalización
  - 15 minutos a 94° C
- ❖ 45 ciclos consistentes en:
  - 20 segundos a 94° C
  - 30 segundos a 56° C
  - 1 minuto a 72° C
- ❖ Incubación:
  - 3 minutos a 72° C
- ❖ Enfriamiento:
  - 4° C

A continuación se defosforilan los dNTPs que no se han incorporado usando una fosfatasa alcalina (SAP, shrimp alkaline Phosphatase). Para eso, se añaden 2 µl de la mezcla detallada en la tabla 5 a cada 5 µl de muestra de reacción de la PCR. A continuación, se incuba en un termociclador en las siguientes condiciones:

- 20 minutos a 37° C
- 5 minutos a 85° C
- Enfriamiento a 4° C

**Tabla 5.** Mezcla de la enzima fosfatasa

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (1rxn)</b>	<b>Volumen (384rxns)</b>
Agua (grado 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
<b>Volumen total</b>	<b>2,00 µl</b>	<b>1060,0 µl</b>

\* El volumen incluye un exceso del 38%

A continuación, se lleva a cabo el ciclo de extensión, empleando la mezcla que se indica en la tabla 6.

Tabla 6. Mezcla de reacción de la extensión

Reactivo	Concentración en 9 $\mu$ l	Volumen (1rxn)	Volumen (384rxns)**
H <sub>2</sub> O (grado HPLC)	NA	0,7395 $\mu$ l	391,97 $\mu$ l
Tampón iPLEX (10x)	0,222x	0,200 $\mu$ l	106,00 $\mu$ l
Mix de extensión iPLEX	0,5x	0,100 $\mu$ l	53,0 $\mu$ l
Primer mix (7 $\mu$ M: 14 $\mu$ M)*	0,625 $\mu$ M:1,25 $\mu$ M	0,94 $\mu$ l	498,12 $\mu$ l
Enzima iPLEX	0,5x	0,0205 $\mu$ l	10,87 $\mu$ l
<b>Total</b>		<b>2,000 <math>\mu</math>l</b>	<b>1060 <math>\mu</math>l</b>

\* 7 $\mu$ M y 14 $\mu$ M ilustran la concentración doble de primers de masa elevada en relación con los de baja masa. En los 9 $\mu$ l de reacción la concentración de primers de baja masa debe ser 0,625  $\mu$ M y la de los de masa elevada 1,25  $\mu$ M

\* El volumen incluye un exceso del 38%.

A continuación, se realiza el siguiente programa en el termociclador:

- ❖ Desnaturalización
  - 15 minutos a 94° C
- ❖ 40 ciclos consistentes en:
  - Desnaturalización 20 segundos a 94° C
  - 5 ciclos de anillamiento extensión
    - Anillamiento 5 segundos a 52° C
    - Extensión 5 segundos a 80° C
- ❖ Extensión final:
  - 3 minutos a 72° C
- ❖ Enfriamiento:
  - 4° C

Figura 15. Lectura de los polimorfismos p16 C540G y G580A

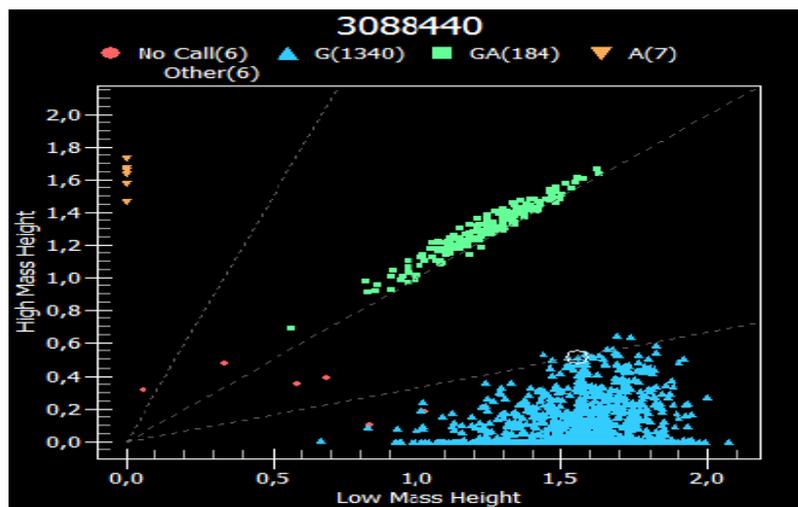
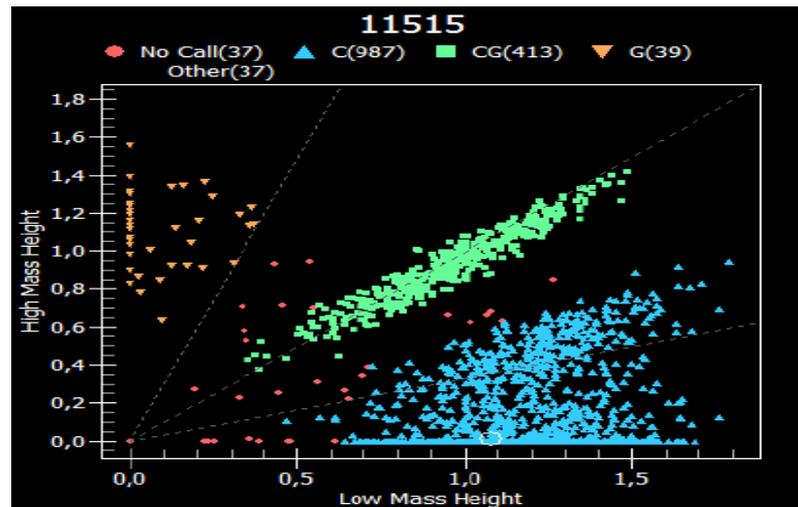
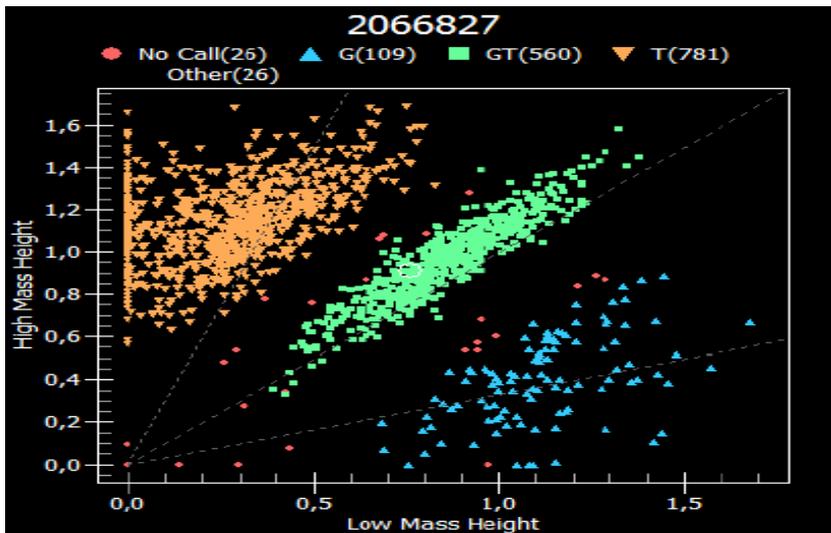
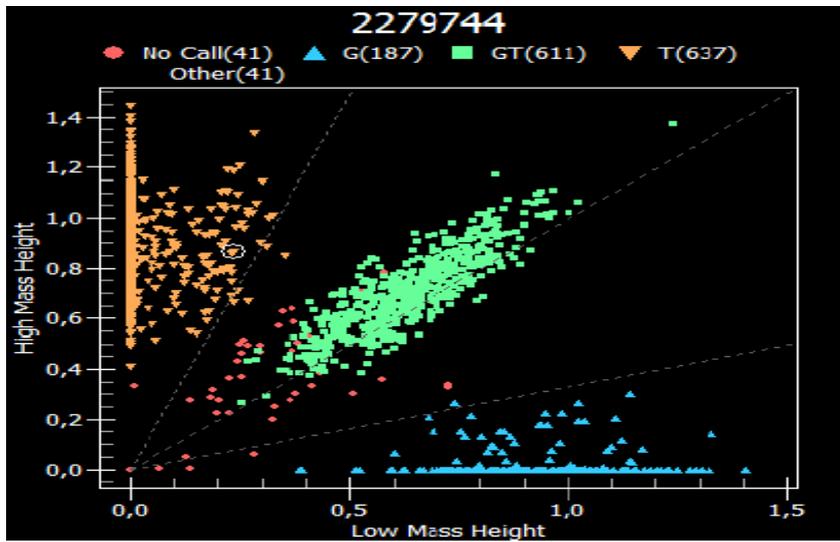


Figura 16. Lectura de los polimorfismos p27 V109G y MDM2 SNP309



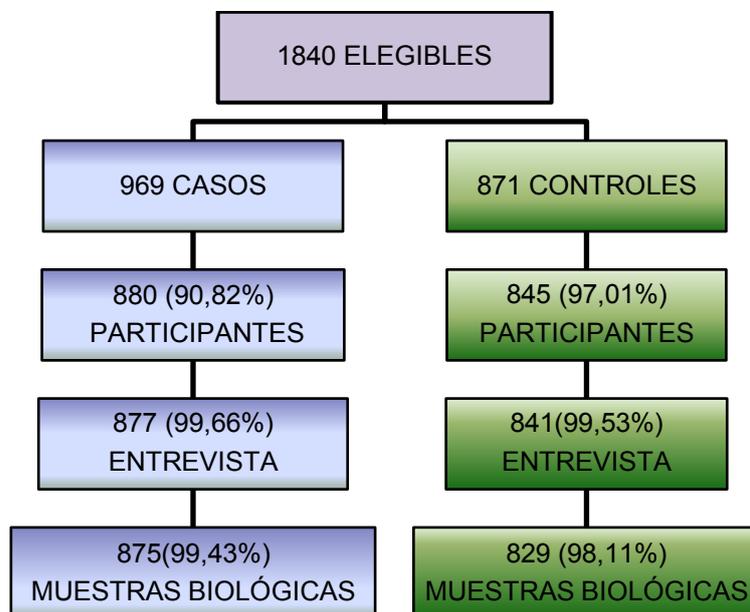


## **RESULTADOS**

## 1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

Hasta el diciembre de 2010, momento en el que finalizó el reclutamiento para el estudio, se registraron en el estudio CAPUA 1840 individuos elegibles de los cuales 969 son casos y 871 controles. De estos, 1725 (93,75%) son participantes en el estudio, 880 casos (90,82%) y 845 controles (97,01%). Con entrevista completa e informatizada tenemos un total de 1718 (99,59%) individuos, 877 casos (99,66%) y 841 controles (99,53%). De los individuos participantes en el estudio se recogieron muestras biológicas de un total de 1704 (98,78%), de los cuales 875 son casos (99,43%) y 829 controles (98,11%).

**Figura 17.** Resumen de los individuos del estudio



Una vez obtenidas las muestras biológicas de los pacientes, se procedió al genotipado de distintos polimorfismos en los individuos del estudio. Debido a la diferente eficacia a la hora de analizar cada uno de estos polimorfismos, el número de individuos analizados en cada caso es ligeramente variable. Así, en el análisis del polimorfismo Ser31Arg de p21 y del Arg72Pro de p53 se incluyeron 675 casos y 675 controles. Se estableció la distribución de género, edad, hábito tabáquico, paquetes-año, ocupación (lista A) y tipo histológico para los casos del estudio. La edad media en casos fue 65,26 y en controles, 64,14. Los tipos histológicos más frecuentes fueron carcinoma epidermoide (40,72%), adenocarcinoma (30,09%) y carcinoma de células pequeñas (17,07%). La distribución de la histología varía por género: en hombres, el tipo histológico más común es el carcinoma de células escamosas (43,29%), mientras en las mujeres predomina el

adenocarcinoma (54,43%). En cuanto al consumo de tabaco, la media de paquetes-año fue de 61,95 en casos y 36,16 en controles.

En el caso del polimorfismo V109G de p27, se genotiparon 766 casos y 685 controles, siendo el tipo histológico más común el epidermoide (40,47%), seguido del adenocarcinoma (29,50%) y el microcítico (17,23%). Sin embargo, en el caso de las mujeres, el tumor más frecuente es el adenocarcinoma (51,89%). Para el SNP309 de MDM2, se obtuvieron datos de 756 casos, de los que 675 son hombres y 81 son mujeres y 670 controles, de los que 573 son hombres y 97 mujeres. La histología más frecuente vuelve a ser epidermoide (40,61%), existiendo diferencias de la distribución en hombres y mujeres, siendo el más frecuente en mujeres el adenocarcinoma (53,09% de los casos femeninos) y en hombres el epidermoide (42,67% de casos masculinos).

Se analizaron 788 casos y 701 controles del polimorfismo p16 G580A, de los que 83 casos y 99 controles son mujeres. En el caso de los hombres, el tumor más frecuente es el epidermoide (42,69%) y en el de las mujeres, el adenocarcinoma (53,01%). Del polimorfismo p16 C540G se obtuvieron datos de 772 casos y 688, siendo 690 hombres entre los casos y 591 entre los controles. Entre los hombres, el 42,89% presentan un carcinoma epidermoide, siendo el tumor más frecuente, mientras que el tumor más frecuente entre las mujeres, el adenocarcinoma, se presenta en el 52,44% de los casos.

## **2. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Ser31Arg DE p21:**

En primer lugar, se exploró la distribución del polimorfismo Ser31Arg en p21. Dada la baja frecuencia de homocigotos Arg/Arg, se formó un grupo con los portadores del alelo Arg (homocigotos y heterocigotos). La frecuencia del alelo Arg de p21 fue de 0,08 en casos y 0,07 en controles. La frecuencia de portadores del alelo Arg carriers en casos fue 16,08 y 13,09 en controles. El polimorfismo Ser31Arg resultó estar en equilibrio de Hardy-Weinberg en la población control ( $\chi^2$ -HW= 0,2917; P= 0,5891).

Al analizar el genotipo Ser31Arg en p21 y su relación con la susceptibilidad al cáncer de pulmón, como se puede observar en la tabla 7, se encontró que en el grupo de los portadores del alelo Arg se apuntaba a un riesgo más elevado de cáncer de pulmón (ORajustada= 1,38; IC95%=0,97-1,96), si bien no se alcanza la significación estadística.

Para todos los polimorfismos estudiados en este estudio se llevó a cabo un análisis estratificado, con el fin de identificar subgrupos de población en los que la asociación fuera más intensa. Con la estratificación se consigue hacer grupos de población homogéneos dentro de una muestra heterogénea. Así, subdividimos la población atendiendo al género, a la edad, al hábito tabáquico y al tipo histológico.

Al realizar el análisis estratificado del polimorfismo Ser31Arg de p21 se pudo comprobar que la estratificación por género muestra que los hombres portadores del alelo variante presentan un riesgo de cáncer de pulmón más alto (ORa= 1,53; IC95%=1,04-2,23). Al haberse encontrado este riesgo significativo en hombres, y al tener un número pequeño de mujeres en nuestra población, centramos el análisis estratificado en el grupo de los hombres. Por edad, en el grupo de hombres menores de 55 años portadores del alelo Arg se dobló el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (ORa= 2,35; IC95%=1,00-5,51).

Atendiendo al hábito tabáquico, se encontró que la posesión del alelo Arg incrementaba el riesgo de cáncer de pulmón en fumadores (ORa=1,75; IC95%= 1,21-2,54), remarcándose este riesgo en fumadores actuales (ORa=2,23; IC95%= 1,24-4,02). Así mismo, se encuentra un aumento de riesgo en el grupo de los que consumen menos de 37 paquetes de cigarrillos al año tanto para los heterocigotos (ORa=2,10; IC 95%= 1,14-3,87) como para los portadores del alelo Arg (ORa=2,03; IC95%= 1,11-3,73).

Por subtipo histológico, el alelo Arg se asocia con un mayor riesgo de cáncer de pulmón en pacientes con carcinoma de células pequeñas (ORa= 2,11; IC95%= 1,15-3,86), así como en pacientes con carcinoma de células escamosas (ORa=1,39; IC95%=0,86-2,26).

**Tabla 7.** Análisis del polimorfismo p21 Ser31Arg

Polimorfismo	Casos		Controles		ORcruda	ORajus*	IC 95%	
	n	%	n	%				
Ser/Ser	565	83.70	589	87,26	1,00	1,00		
Ser/Arg	107	15.85	80	11,85	1,39	1,42	0,99	2,03
Arg/Arg	3	0.44	6	0,89	0,52	0,59	0,09	4,07
Arg-carriers	110	16.30	86	12,74	1,33	1,38	0,97	1,96
Frecuencia alelo Arg	0,08		0,07					

\* Ajustado por edad, género, hª familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

Tabla 8. Análisis estratificado de p21

Variable	Caso/Control				OR <sup>a</sup> ajustada [IC 95%]		
	Ser/Ser	Ser/Arg	Arg/Arg	Arg-carriers	Ser/Ser	Ser/Arg	Arg-carriers
	565/589	107/80	3/6	110/86	1,00	1,42 [0,99-2,03]	1,38 [0,97-1,96]
<b>Género</b>							
Hombre	497/527	95/63	3/5	98/68	1,00	<b>1,58 [1,07-2,33]</b>	<b>1,53 [1,04-2,23]</b>
Mujer	68/62	12/17	0/1	12/18	1,00	0,68 [0,27-1,69]	0,65 [0,26-1,61]
<b>Edad (años)</b>							
<55	79/116	21/11	1/1	22/12	1,00	<b>2,43 [1,02-5,79]</b>	<b>2,35 [1,00-5,51]</b>
55-69	206/190	35/25	1/2	36/27	1,00	1,28 [0,69-2,39]	1,24 [0,67-2,29]
≥70	212/221	39/27	1/2	40/29	1,00	1,62 [0,89-2,97]	1,54 [0,85-2,78]
<b>Hábito tabáquico</b>							
No fumador	7/116	0/13	0/4	0/17	1,00	-	-
Fumador	490/411	95/50	3/1	98/51	1,00	<b>1,73 [1,19-2,52]</b>	<b>1,75 [1,21-2,54]</b>
Ex-fumador	239/240	42/31	2/1	44/32	1,00	1,47 [0,87-2,47]	1,48 [0,88-2,47]
Fumador actual	249/162	53/17	1/0	54/17	1,00	<b>2,18 [1,21-3,93]</b>	<b>2,23 [1,24-4,02]</b>
<b>Paquetes-año</b>							
<37	113/249	23/29	0/1	23/30	1,00	<b>2,10 [1,14-3,87]</b>	<b>2,03 [1,11-3,73]</b>
≥37	477/174	90/24	4/0	94/24	1,00	1,37 [0,84-2,24]	1,43 [0,88-2,32]
<b>Tipo histológico</b>							
Epidermoide	215/527	38/63	2/5	40/68	1,00	1,39 [0,85-2,29]	1,39 [0,86-2,26]
Adenocarcinoma	136/527	22/63	0/5	22/68	1,00	1,09 [0,61-1,96]	1,05 [0,59-1,87]
Microcítico	80/527	20/63	1/5	21/68	1,00	<b>2,15 [1,16-3,98]</b>	<b>2,11 [1,15-3,86]</b>

<sup>a</sup>Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

### 3. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO Arg72Pro de p53

La frecuencia del alelo Pro en nuestra población es de 0,27 en casos y 0,24 en controles, siendo el 6,61% de casos y el 5,84% de controles homocigotos para el alelo variante. Nuestra población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weimberg para este polimorfismo ( $X^2$ -HW= 0,0258; P= 0,872). Se puede observar en la tabla 9 la distribución de los distintos genotipos para este polimorfismo en nuestra muestra, encontrándose que el ser portador del alelo de riesgo Pro no se traduce en un aumento de riesgo (ORa=1,19; IC 95%=0,91-1,54).

Al hacer un análisis estratificado del polimorfismo Arg72Pro de p53 no se observa un aumento de riesgo debido al alelo Pro según el sexo. Debido al pequeño número de mujeres presente en la muestra, decidimos llevar a cabo el análisis estratificado en hombres únicamente. Debido también al escaso número de individuos homocigotos para el alelo Pro, se decidió establecer un único grupo de portadores del alelo Pro.

Al hacerlo, se pudo comprobar un aumento de riesgo tanto en heterocigotos como en el grupo de portadores del alelo Pro para los fumadores (ORa=1,40; IC95%= 1,05-1,85; ORa= 1,43; IC95%=1,09-1,86), siendo especialmente acusado en el grupo de los ex-fumadores, siendo para los heterocigotos ORa=1,69; IC95%=1,14-2,50 y para los portadores del alelo Pro ORa=1,72; IC95%=1,18-2,51. Por consumo, se encuentra un aumento de riesgo para los que fuman más de 37 paquetes al año ORa=1,55; IC 95%= 1,05-2,30 para los heterocigotos y ORa=1,47; IC95%=1,01-2,14 para los portadores del alelo Pro.

En cuanto a la edad, no se encontró aumento de riesgo asociado a la presencia de este polimorfismo ORa=1,03; IC 95%= 0,54-1,96 para menores de 55 años, ORa =0,99; IC95%= 0,63-1,54 para el grupo comprendido entre los 55 y los 69 años y finalmente, ORa=1,48; IC95%=0,96-2,27 para los de 70 o más años.

Por tipo histológico tampoco se encontró una asociación entre la presencia del polimorfismo y un aumento de riesgo, tanto para el epidermoide (ORa=1,28; IC95%=0,90-1,82) como para el adenocarcinoma (ORa=1,05; IC95%=0,71-1,56) y el microcítico (ORa=1,45; IC95%= 0,90-2,34).

**Tabla 9.** Análisis del polimorfismo Arg72Pro de p53

Polimorfismo	Casos		Controles		p-valor*	ORajus**	IC 95%	
	n	%	n	%				
Arg/Arg	341	52,38	318	58,03		1,00		
Arg/Pro	267	41,01	198	36,13	0,133	1,16	0,88	1,53
Pro/Pro	43	6,61	32	5,84		1,34	0,78	2,32
Pro-carriers	310	47,62	230	41,97		1,19	0,91	1,54
	651	100	548	100				

\* Chi2 p-valor;

\*\* Ajustado por edad, género, hª familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

Tabla 10. Análisis estratificado del polimorfismo Arg72Pro de p53.

Variable	Caso/Control				OR <sup>a</sup> ajustada [IC 95%]		
	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro/Pro	Pro-car	Arg/Arg	Arg/Pro	Pro-carriers
	341/318	267/198	43/32	310/230	1,00	1,16 [0,88-1,53]	1,19 [0,91-1,54]
<b>Género</b>							
Hombre	303/280	236/177	41/29	277/206	1,00	1,12 [0,84-1,49]	1,17 [0,88-1,53]
Mujer	38/38	31/21	2/3	33/24	1,00	2,18 [0,94-5,03]	1,73 [0,79-3,83]
<b>Análisis estratificado (solo hombres)</b>							
<b>Edad (años)</b>							
<55	49/58	38/42	9/7	47/49	1,00	0,95 [0,48-1,87]	1,03 [0,54-1,96]
55-69	129/107	91/67	16/11	107/78	1,00	0,94 [0,59-1,50]	0,99 [0,63-1,54]
≥70	125/115	107/68	16/11	123/79	1,00	1,44 [0,92-2,25]	1,48 [0,96-2,27]
<b>Háb tabáquico</b>							
No fumador	5/48	2/45	0/7	2/52	1,00	0,42 [0,07-2,45]	0,36 [0,06-2,03]
Fumador	298/232	234/132	41/22	275/154	1,00	<b>1,40 [1,05-1,85]</b>	<b>1,43 [1,09-1,86]</b>
Ex-fumador	139/138	116/71	22/13	138/84	1,00	<b>1,69 [1,14-2,50]</b>	<b>1,72 [1,18-2,51]</b>
Fumador actual	158/90	117/55	19/8	136/63	1,00	1,16 [0,76-1,76]	1,20 [0,80-1,80]
<b>Paquetes-año</b>							
<37	63/135	35/79	12/11	47/90	1,00	0,98 [0,58-1,64]	1,17 [0,72-1,89]
≥37	234/95	199/53	29/11	228/64	1,00	<b>1,55 [1,05-2,30]</b>	<b>1,47 [1,01-2,14]</b>
<b>Tipo histológico</b>							
Epidermoide	129/280	103/177	15/29	118/206	1,00	1,28 [0,89-1,85]	1,28 [0,90-1,82]
Adenocarcinoma	85/280	61/177	9/29	70/206	1,00	1,09 [0,72-1,64]	1,05 [0,71-1,56]
Microcítico	47/280	41/177	11/29	52/206	1,00	1,32 [0,79-2,19]	1,45 [0,90-2,34]

<sup>a</sup> Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

#### 4. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO V109G DE p27:

Al estudiarse la distribución de este polimorfismo en nuestra población, se encontró que la frecuencia del alelo variante G era de 0,26 en casos y controles. La proporción de individuos homocigotos para el alelo variante es del 7,70% en casos y 6,57% en controles. Este polimorfismo se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $X^2$ -HW= 0,2056; P= 0,650).

En cuanto a la relación de este polimorfismo con la susceptibilidad del cáncer de pulmón, no se encontró un aumento de riesgo en los homocigotos para el alelo G (ORa=1,17; IC95%=0,72-1,92). Tampoco para el grupo de portadores del alelo G (ORa=1,01; IC95%=0,80-1,29).

Dado el bajo número de homocigotos G/G, se hizo el grupo G-carriers que incluye a los portadores del alelo G, esto es, heterocigotos y homocigotos G/G. No se encontró un aumento de riesgo en hombres portadores del alelo G (ORa=0,96; IC95%=0,74-1,23) ni en mujeres (ORa=1,11; IC95%=0,56-2,20). Por edad, tampoco parece existir un aumento de riesgo en los tres grupos estudiados: menores de 55 años (ORa=0,91; IC95%=0,52-1,61); entre 55 y 69 años (ORa=1,20; IC95%=0,82-1,76) y mayores de 70 (ORa=0,83; IC95%=0,57-1,22).

Por hábito tabáquico, no se encontró aumento de riesgo para los fumadores (ORa=0,97; IC95%=0,77-1,23). En cuanto al grado de consumo de cigarrillos, tampoco se encontró asociación (tabla 12). Atendiendo al tipo histológico, los individuos portadores del alelo G no presentan un aumento de riesgo para ninguno de los tres tipos más comunes: epidermoide, adenocarcinoma y microcítico (ORa=0,79; IC95%=0,57-1,09; ORa=1,17; IC95%=0,83-1,64; ORa=1,37; IC95%=0,90-2,08).

**Tabla 11.** Análisis del polimorfismo V109G p27

Polimorfismo	Casos		Controles		p-valor*	ORajus**	IC 95%	
	n	%	n	%				
T/T	421	54,96	370	54,01		1,00		
T/G	286	37,34	270	39,42	0,573	0,99	0,77	1,27
G/G	59	7,70	45	6,57		1,17	0,72	1,92
G-carriers	345	45,04	315	45,99		1,01	0,80	1,29
	766	100	685	100				

\* Chi2 p-valor

\*\* Ajustado por edad, género, hª familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

Tabla12. Análisis estratificado del polimorfismo V109G de p27

Variable	Caso/Control			OR <sup>a</sup> ajustada [IC 95%]		
	T/T	T/G	G-Carriers	T/T	T/G	G-carriers
	421/370	286/270	345/315	1,00	0,99 [0,77-1,27]	1,01 [0,80-1,29]
<b>Género</b>						
Hombre	383/317	252/232	304/272	1,00	0,94 [0,72-1,22]	0,96 [0,74-1,23]
Mujer	38/53	34/38	41/43	1,00	0,96 [0,47-1,98]	1,11 [0,61-2,20]
<b>Edad (años)</b>						
<55	61/86	54/61	62/73	1,00	0,90[0,50-1,63]	0,91 [0,52-1,61]
55-69	166/140	118/99	151/118	1,00	1,14 [0,76-1,71]	1,20 [0,82-1,76]
≥70	194/144	114/110	132/124	1,00	0,84 [0,57-1,24]	0,83 [0,57-1,22]
<b>Hábito tabáquico</b>						
No fumador	23/105	16/78	22/89	1,00	1,80 [0,73-4,43]	1,88 [0,79-4,44]
Fumador	398/265	270/192	323/226	1,00	0,94 [0,74-1,21]	0,97 [0,77-1,23]
Ex-fumador	196/153	114/110	132/133	1,00	0,84 [0,59-1,20]	0,81 [0,58-1,14]
Fumador actual	201/104	155/80	190/90	1,00	0,98 [0,67-1,42]	1,09 [0,76-1,56]
<b>Paquetes-año</b>						
<37	90/160	57/114	69/137	69/137	0,84 [0,54-1,30]	0,88[0,58-1,33]
≥37	308/103	212/78	253/89	253/89	0,96 [0,67-1,36]	1,00 [0,71-1,40]
<b>Tipo histológico</b>						
Epidermoide	187/370	102/270	123/315	1,00	0,76 [0,54-1,07]	0,79 [0,57-1,09]
Adenocarcinoma	120/370	90/270	106/315	1,00	1,19 [0,84-1,70]	1,17 [0,83-1,64]
Microcítico	60/370	61/270	72/315	1,00	1,34 [0,86-2,08]	1,37 [0,90-2,08]

<sup>a</sup>Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón y ocupación (lista A)

## 5. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO 309 DE MDM2:

La frecuencia del alelo variante G en nuestra población era de 0,37 en controles y de 0,33 en casos. La población control se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $X^2$ -HW= 3,5303; P= 0,060).

Al estudiar la relación de este polimorfismo con la susceptibilidad del cáncer de pulmón, no se encontró un aumento de riesgo en los homocigotos para el alelo G (ORa=0,80; IC95%=0,55-1,17).

Al hacer el análisis estratificado, debido al pequeño número de homocigotos G/G presentes en ciertos grupos, se unieron los heterocigotos y los homocigotos G/G en un único grupo de G-carriers. No se encontró un aumento de riesgo en hombres portadores del alelo G (ORa=0,96; IC95%=0,74-1,24) ni en mujeres (ORa=0,80; IC95%=0,41-1,55). Por edad, tampoco parece existir un aumento de riesgo en los menores de 55 años (ORa=0,69; IC95%=0,39-1,22); entre 55 y 69 años (ORa=1,02; IC95%=0,69-1,50) y mayores de 70 (ORa=1,00; IC95%=0,68-1,47).

Por hábito tabáquico, no se encontró aumento de riesgo para los fumadores (ORa=1,06; IC95%=0,45-2,47). Tampoco se encontró riesgo en función de la intensidad del consumo (datos en la tabla 14). Atendiendo al tipo histológico, los individuos portadores del alelo G no presentan un aumento de riesgo (ORa=0,94; IC95%=0,68-1,31; ORa=0,93; IC95%=0,66-1,32; ORa=0,86; IC95%=0,56-1,32 para epidermoide, adenocarcinoma y microcítico respectivamente).

**Tabla 13.** Análisis del polimorfismo 309 de MDM2

Polimorfismo	Casos		Controles		p-valor*	ORajus**	IC 95%	
	n	%	n	%				
T/T	339	44,84	279	41,64		1,00		
T/G	329	43,52	289	43,13	0,118	0,94	0,76	1,29
G/G	88	11,64	102	15,22		0,80	0,55	1,17
G-carriers	417	55,16	391	58,36		0,94	0,74	1,21
	756	100	670	100				

\* Chi2 p-valor

\*\* Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

Tabla 14. Análisis estratificado del polimorfismo MDM2 SNP 309

Variable	Caso/Control			OR <sup>a</sup> ajustada [IC 95%]		
	T/T	T/G	G-Carriers	T/T	T/G	G-Carriers
	339/279	329/289	417/391	1,00	0,99 [0,76-1,29]	0,94 [0,74-1,21]
<b>Género</b>						
Hombre	300/239	300/252	375/334	1,00	1,01 [0,77-1,34]	0,96 [0,74-1,24]
Mujer	39/40	29/37	42/57	1,00	0,82 [0,39-1,71]	0,80 [0,41-1,55]
<b>Edad (años)</b>						
<55	59/59	49/72	62/96	1,00	0,68[0,37-1,24]	0,69 [0,39-1,22]
55-69	137/112	135/102	175/142	1,00	1,00 [0,65-1,53]	1,02 [0,69-1,50]
≥70	143/108	145/115	180/153	1,00	0,97 [0,64-1,46]	1,00 [0,68-1,47]
<b>Hábito tabáquico</b>						
No fumador	20/83	18/83	28/109	1,00	0,93 [0,36-2,41]	1,06 [0,45-2,47]
Fumador	319/196	311/206	389/282	1,00	0,95 [0,73-1,23]	0,88 [0,69-1,13]
Ex-fumador	135/120	149/110	186/156	1,00	1,19 [0,82-1,73]	1,06 [0,75-1,50]
Fumador actual	184/72	160/92	201/120	1,00	0,71[0,48-1,05]	0,71 [0,49-1,02]
<b>Paquetes-año</b>						
<37	65/121	67/119	86/169	1,00	1,19 [0,76-1,86]	1,08[0,70-1,64]
≥37	254/75	243/85	302/111	1,00	0,87 [0,60-1,25]	0,85 [0,60-1,20]
<b>Tipo histológico</b>						
Epidermoide	136/279	130/289	41/102	1,00	0,96 [0,67-1,35]	0,94 [0,68-1,31]
Adenocarcinoma	99/279	100/289	23/102	1,00	1,03 [0,71-1,48]	0,93 [0,66-1,32]
Microcítico	59/279	56/289	15/102	1,00	0,89 [0,56-1,41]	0,86 [0,56-1,32]

<sup>a</sup>Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón y ocupación (lista A)

## 6. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO G580A DE p16

La frecuencia del alelo variante A en nuestra población era de 0,06 en casos y 0,07 en controles y se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $X^2$ -HW= 0,4832; P= 0,487).

Al estudiar la relación de este polimorfismo con la susceptibilidad del cáncer de pulmón, se agruparon los heterocigotos y homocigotos portadores del alelo A debido a la baja frecuencia del mismo. No se encontró un aumento de riesgo en los portadores del alelo A (ORa=1,13; IC95%=0,79-1,62).

Al hacer el análisis estratificado, no se encontró un aumento de riesgo en hombres portadores (ORa=1,05; IC95%=0,72-1,3) ni en mujeres (ORa=1,44; IC95%=0,54-3,79). Por edad, tampoco parece existir un aumento de riesgo en los menores de 55 años (ORa=0,51; IC95%=0,21-1,28); entre 55 y 69 años (ORa=1,66; IC95%=0,92-3,00) y mayores de 70 (ORa=1,13; IC95%=0,65-1,96).

Por hábito tabáquico, no se encontró aumento de riesgo para los fumadores (ORa=0,97; IC95%=0,68-1,40). Atendiendo al tipo histológico, la presencia del alelo A no parece presentar un aumento de riesgo (Ora=0,94; IC95%=0,57-1,54; ORa=1,32; IC95%=0,80-2,16; ORa=1,49; IC95%=0,82-2,69 para epidermoide, adenocarcinoma y microcítico respectivamente).

**Tabla 15.** Análisis del polimorfismo G580A de p16

Polimorfismo	Casos		Controles		p-valor*	ORajus**	IC 95%	
	n	%	n	%				
G/G	690	87,56	609	86,88		1,00		
G/A	94	11,93	90	12,84	0,696	1,10	0,76	1,58
A/A	4	0,51	2	0,29		4,36	0,40	47,70
A-carriers	98	12,44	92	13,12		1,13	0,79	1,62
	788	100	701	100				

\* Chi2 p-valor

\*\* Ajustado por edad, género, hª familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

Tabla 16. Análisis estratificado del polimorfismo G580A de p16

Variable	Caso/Control			OR <sup>a</sup> ajustada [IC 95%]		
	G/G 690/609	G/A 94/90	A-carriers 98/92	G/G 1,00	G/A 1,10 [0,76-1,58]	A-carriers 1,13 [0,79-1,62]
<b>Género</b>						
Hombre	616/523	86/78	89/79	1,00	1,04 [0,71-1,51]	1,05 [0,72-1,53]
Mujer	74/86	8/12	9/13	1,00	1,43 [0,52-3,96]	1,44 [0,54-3,79]
<b>Edad (años)</b>						
<55	118/134	10/26	10/27	1,00	0,51 [0,21-1,28]	0,51 [0,21-1,28]
55-69	278/234	42/30	45/30	1,00	1,59 [0,88-2,87]	1,66 [0,92-3,00]
≥70	294/241	42/34	43/35	1,00	1,10 [0,63-1,93]	1,13 [0,65-1,96]
<b>Hábito tabáquico</b>						
No fumador	39/171	8/28	9/29	1,00	1,62 [0,53-4,96]	1,81 [0,62-5,27]
Fumador	651/438	86/62	89/63	1,00	0,94 [0,65-1,36]	0,97 [0,68-1,40]
Ex-fumador	289/256	48/36	49/36	1,00	1,22 [0,74-2,03]	1,25 [0,76-2,07]
Fumador actual	360/172	38/25	40/26	1,00	0,70 [0,40-1,21]	0,73 [0,42-1,26]
<b>Paquetes-año</b>						
<37	148/263	14/40	15/41	1,00	0,73 [0,37-1,43]	0,79 [0,41-1,52]
≥37	502/173	72/22	74/22	1,00	1,15 [0,68-1,95]	1,18 [0,69-1,99]
<b>Tipo histológico</b>						
Epidermoide	287/609	33/90	33/92	1,00	0,95 [0,58-1,56]	0,94 [0,57-1,54]
Adenocarcinoma	198/609	33/90	35/92	1,00	1,26 [0,76-2,09]	1,32 [0,80-2,16]
Microcítico	115/609	19/90	19/92	1,00	1,50 [0,83-2,71]	1,49 [0,82-2,69]

<sup>a</sup>Ajustado por edad, género. H<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón y ocupación (lista A)

## 7. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO C540G DE p16

La frecuencia del alelo variante G en nuestra población era de 0,18 en casos y controles y se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $X^2$ -HW= 0,1134; P= 0,736).

Al estudiar la relación de este polimorfismo con la susceptibilidad del cáncer de pulmón, se agruparon los heterocigotos y homocigotos portadores del alelo G. No se ha encontrado un aumento de riesgo en los portadores del alelo G (ORa=1,01; IC95%=0,78-1,31).

Al hacer el análisis estratificado, no se encontró un aumento de riesgo en hombres portadores (ORa=0,98; IC95%=0,75-1,29) ni en mujeres (ORa=1,18; IC95%=0,58-2,42). Por edad, tampoco parece existir un aumento de riesgo en los menores de 55 años (ORa=1,05; IC95%=0,58-1,92); entre 55 y 69 años (ORa=0,99; IC95%=0,6-1,50) y mayores de 70 (ORa=1,02; IC95%=0,68-1,51).

Por hábito tabáquico, no se encontró aumento de riesgo para los fumadores (ORa=1,00; IC95%=0,77-1,28). Tampoco se encontró un aumento de riesgo en los fumadores más consumidores, siendo para los fumadores de más de 37 paquetes al año la ORa=0,92; IC95%=0,65-1,32. Atendiendo al tipo histológico, la presencia del alelo G no parece presentar un aumento de riesgo (Ora=1,21; IC95%=0,87-1,69; ORa=0,97; IC95%=0,67-1,40; ORa=0,95; IC95%=0,61-1,49 para epidermoide, adenocarcinoma y microcítico respectivamente).

**Tabla 17.** Análisis del polimorfismo C540G de p16

Polimorfismo	Casos		Controles		p-valor*	ORajus**	IC 95%	
	n	%	n	%				
C/C	516	66,84	466	67,73		1,00		
C/G	234	30,31	202	29,36	0,696	0,99	0,76	1,29
G/G	22	2,85	20	2,91		1,27	0,60	2,66
G-carriers	256	33,16	222	32,27		1,01	0,78	1,31
	772	100	688	100				

\* Chi2 p-valor

\*\* Ajustado por edad, género, hª familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

Tabla 18. Análisis estratificado de p16 C540G

Variable	Caso/Control			OR <sup>a</sup> ajustada [IC 95%]		
	C/C	C/G	G-carriers	C/C	C/G	G-carriers
	516/466	234/202	256/222	1,00	0,99 [0,76-1,29]	1,01 [0,78-1,31]
<b>Género</b>						
Hombre	464/397	207/176	226/194	1,00	0,98 [0,74-1,30]	0,98 [0,75-1,29]
Mujer	52/69	27/26	30/28	1,00	1,04 [0,49-2,20]	1,18 [0,58-2,42]
<b>Edad (años)</b>						
<55	84/108	38/47	40/50	1,00	1,03 [0,56-1,89]	1,05 [0,58-1,92]
55-69	214/178	96/72	104/81	1,00	1,00 [0,65-1,53]	0,99 [0,66-1,50]
≥70	218/180	100/83	112/91	1,00	0,97 [0,64-1,46]	1,02 [0,68-1,51]
<b>Fumador</b>						
No fumador	33/142	12/49	14/57	1,00	0,75 [0,26-2,20]	0,98 [0,37-2,58]
Fumador	483/324	222/153	242/165	1,00	0,99 [0,76-1,28]	1,00 [0,77-1,28]
Ex-fumador	218/193	100/87	111/90	1,00	1,06 [0,73-1,53]	1,13 [0,79-1,63]
Fumador actual	263/124	122/63	131/71	1,00	0,91 [0,62-1,34]	0,86 [0,59-1,25]
<b>Paquetes-año</b>						
<37	105/200	47/91	51/98	1,00	0,98 [0,62-1,54]	0,99 [0,64-1,53]
≥37	377/123	175/61	191/66	1,00	0,92 [0,64-1,33]	0,92 [0,65-1,32]
<b>Tipo histológico</b>						
Epidermoide	209/466	99/202	106/222	1,00	1,20 [0,85-1,69]	1,21 [0,87-1,69]
Adenocarcinoma	155/466	64/202	70/222	1,00	0,96 [0,66-1,40]	0,97 [0,67-1,40]
Microcítico	86/466	42/202	46/222	1,00	0,96 [0,61-1,52]	0,95 [0,61-1,49]

<sup>a</sup>Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón y ocupación (lista A)

## **8. ANÁLISIS COMBINADO DE POLIMORFISMOS**

Puesto que los genes no actúan independientemente, sino que forman parte de cadenas que integran procesos biológicos, hemos querido realizar el análisis combinado de varias parejas de los genes estudiados, ya sea porque actúan como reguladores o efectores unos de otros (sea el caso de p21 y p53 o de p53 y MDM2) o porque sus funciones sean complementarias o sinérgicas (caso de p21 y p27).

### **8.1. Análisis combinado de los polimorfismos p21 Ser31Arg y p53 Arg72Pro:**

Al estudiar el efecto conjunto de los alelos de riesgo de p21 y p53 se tomó como grupo de referencia los homocigotos Ser/Ser de p21 y los Arg/Arg de p53. En el grupo de riesgo moderado se incluyó a los individuos que tuvieran al menos un alelo de riesgo (portadores del alelo Arg de p21 y homocigotos Arg/Arg de p53 o portadores del alelo Pro de p53 y homocigotos Ser/Ser de p21), y se consideraron de alto riesgo los individuos portadores del alelo Arg de p21 y el alelo Pro de p53.

Atendiendo a la estratificación por género, los resultados están en concordancia con lo descrito anteriormente. Los hombres con el genotipo de alto riesgo presentaron un incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón (ORa=2,29; IC95%=1,21-4,32). Teniendo esto en cuenta, el análisis estratificado se llevó a cabo en el grupo de los hombres. Parece que el genotipo de alto riesgo eleva el riesgo en los menores de 55 años (ORa= 4,02; IC95%= 0,91-17,79).

La estratificación por hábito tabáquico reveló un riesgo más elevado para los fumadores (ORa= 3,61; IC95%=1,80-7,22), especialmente para los fumadores actuales (ORa=4,25; IC95%=1,41-12.82). También aparece un riesgo elevado en el grupo de los que fuman más de 37 paquetes al año (ORa=3,52; IC95%=1,21-10,21). En cuanto al tipo histológico, se encontró que se incrementaba el riesgo de desarrollar carcinoma epidermoide (ORa=2.52; IC95% =1.15-5.53) y de células pequeñas (ORa= 4.22; IC95%= 1.65-10.77) en el grupo de individuos con genotipo de alto riesgo.

Tabla 19: Análisis estratificado de los polimorfismos p21 Ser31Arg y p53 Arg72Pro

Variable	Caso/Control			OR <sup>a</sup> ajustada [IC 95%]	
	Referencia <sup>b</sup>	Moderado <sup>c</sup>	Alto <sup>d</sup>	Moderado <sup>c</sup>	Alto <sup>d</sup>
<b>Género</b>					
Hombre	252/241	283/227	45/18	1,09 [0,82-1,44]	<b>2,29 [1,21-4,32]</b>
Mujer	33/30	31/28	7/4	1,20 [0,53-2,72]	2,48 [0,55-11,14]
<b>Análisis estratificado, solo hombres</b>					
<b>Edad (años)</b>					
<55	38/53	48/51	10/3	1,13 [0,58-2,20]	4,02 [0,91-17,79]
55-69	113/89	104/89	19/7	0,86 [0,55-1,36]	1,69 [0,59-4,80]
≥70	101/99	131/87	16/8	1,41 [0,91-2,18]	2,37 [0,89-6,30]
<b>Fumador</b>					
No fumador	5/44	2/49	0/7	0,38 [0,07-2,15]	-
Fumador	247/197	281/178	45/11	1,29 [0,98-1,70]	<b>3,61 [1,80-7,22]</b>
Ex-fumador	115/116	142/100	20/6	<b>1,56 [1,07-2,29]</b>	<b>3,12 [1,19-8,20]</b>
Fumador actual	131/78	138/71	25/4	1,12 [0,74-1,68]	<b>4,25 [1,41-12,82]</b>
<b>Paquetes-año</b>					
<37	53/117	48/101	9/7	1,10 [0,67-1,79]	0,98 [0,58-1,64]
≥37	193/78	233/77	36/4	1,25 [0,85-1,82]	<b>3,52 [1,21-10,21]</b>
<b>Tipo histológico</b>					
Epidermoide	108/241	121/227	18/18	1,12 [0,78-1,61]	<b>2,59 [1,18-5,69]</b>
Adenocarcinoma	72/241	74/227	9/78	0,95 [0,63-1,43]	1,44 [0,54-3,80]
Microcítico	38/41	50/227	11/18	1,30 [0,78-2,15]	<b>4,33 [1,70-11,06]</b>

<sup>a</sup> Ajustado por edad, género, paquetes-año, historia familiar de cáncer de pulmón y ocupación (lista A) según corresponda

<sup>b</sup> p21Ser/Ser y p53 Arg/Arg.

<sup>c</sup> p21 Arg-carriers y p53 Arg/Arg o p21 Ser/Ser y p53 Pro-carriers.

## 8.2. Análisis combinado de los polimorfismos p21 Ser31Arg y V109G de p27:

Al estudiar el efecto combinado de estos dos genes no se encontró un aumento de riesgo para los portadores del genotipo de alto riesgo (portadores del alelo Arg de p21 y del alelo G de p27) en la población general (ORa=1.12; IC95%=0.66-1.89).

**Tabla 20:** Análisis combinado de los polimorfismos p21 Ser31Arg y p27 V109G

Polimorfismo	Casos		Controles		p-valor*	ORajus**	IC 95%	
	n	%	n	%				
Referencia <sup>a</sup>	349	45,56	322	47,01		1,00		
Moderado <sup>b</sup>	370	48,30	325	47,45	0,805	1,05	0,89	1,47
Alto <sup>c</sup>	47	6,14	38	5,55		1,14	0,66	1,89
	766	100	685	100				

\* Chi2 p-valor

\*\* Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

<sup>a</sup> p21 Ser/Ser y p27 T/T

<sup>b</sup> p21 Arg-carriers y p27 T/T o p27 G-carriers y p21 Ser/Ser

<sup>c</sup> p21 Arg-carriers y p27 G-carriers

Al hacer el análisis estratificado, no se encuentra riesgo en razón de género o de edad. Sí se encuentra un aumento de riesgo para el genotipo de alto riesgo para los fumadores actuales (ORa=3.11; IC 95% =1.14-8.47) y por histología, para el carcinoma microcítico (ORa=2.34; IC95%=1.02-5.35), como se aprecia en la tabla 21.

Tabla 21: Análisis estratificado de los polimorfismos p21 Ser31Arg y p27 V109G

Variable	Caso/Control			OR*ajustada [IC 95%]	
	Referencia <sup>a</sup>	Moderado <sup>b</sup>	Alto <sup>c</sup>	Moderado <sup>b</sup>	Alto <sup>c</sup>
<b>Género</b>					
Hombre	317/281	328/279	42/29	1,10 [0,85-1,43]	1,20 [0,67-2,13]
Mujer	32/41	42/46	5/9	0,97 [0,48-1,96]	0,66 [0,17-2,58]
<b>Edad (años)</b>					
<55	48/76	64/76	11/7	1,19 [0,67-2,13]	1,63 [0,48-5,55]
55-69	133/118	168/125	16/15	1,36 [0,92-2,01]	1,06 [0,44-2,55]
≥70	168/128	138/124	20/16	0,90 [0,61-1,33]	0,92 [0,42-2,04]
<b>Fumador</b>					
No fumador	20/87	23/95	2/12	1,58 [0,65-3,85]	0,81[0,14-4,54]
Fumador	329/235	347/230	45/26	1,16 [0,91-1,48]	1,23 [0,73-2,07]
Ex-fumador	167/135	143/131	18/20	0,97 [0,69-1,38]	0,73 [0,36-1,49]
Fumador actual	161/93	203/96	27/5	1,29 [0,89-1,86]	<b>3,11 [1,14-8,47]</b>
<b>Paquetes-año</b>					
<37	75/142	75/138	9/17	1,11 [0,67-1,79]	1,03[0,43-2,48]
≥37	254/91	271/92	36/9	1,12 [0,85-1,82]	1,43 [0,66-3,13]
<b>Tipo histológico</b>					
Epidermoide	153/322	142/325	15/38	1,01 [0,73-1,40]	0,75 [0,35-1,60]
Adenocarcinoma	103/322	109/325	14/38	1,13 [0,80-1,61]	1,25 [0,61-2,55]
Microcítico	47/322	74/325	11/38	1,54 [0,99-2,41]	<b>2,34[1,02-5,35]</b>

\*Ajustado por edad, género, paquetes-año, historia familiar de cáncer de pulmón y ocupación (lista A) según corresponda

<sup>a</sup> p21 Ser/Ser y p27 T/T

<sup>b</sup> p21 Arg-carriers y p27 T/T o p27 G-carriers y p21 Ser/Ser

<sup>b</sup> p21 Arg-carriers y p27 G-carriers

### 8.3. Análisis combinado de los polimorfismos p53 Arg72Pro y SNP309 de MDM2:

El análisis del efecto combinado de estos dos polimorfismos no reveló un aumento de riesgo en la población de nuestro estudio para los portadores del genotipo de alto riesgo (portadores del alelo Pro de p53 y del alelo G de MDM2) ( $ORa=1.07$ ;  $IC95\%=0.74-1.55$ ).

**Tabla 22:** Análisis combinado de los polimorfismos p53 Arg72Pro y MDM2 SNP309

Polimorfismo	Casos		Controles		p-valor*	ORajus**	IC 95%	
	n	%	n	%				
Referencia <sup>a</sup>	182	25,07	128	23,97		1,00		
Moderado <sup>b</sup>	342	47,11	278	52,06	0,180	0,87	0,63	1,19
Alto <sup>c</sup>	202	27,82	128	23,97		1,11	0,74	1,55
	726	100	685	100				

\* Chi2 p-valor

\*\* Ajustado por edad, género, h<sup>a</sup> familiar de cáncer de pulmón, paquetes-año y ocupación (lista A)

<sup>a</sup> p53 Arg/Arg y MDM2 T/T

<sup>b</sup> p53 Pro-carriers y MDM2 T/T o MDM2 G-carriers y p53 Arg/Arg

<sup>c</sup> p53 Pro-carriers y MDM2 G-carriers

Por géneros, el genotipo de alto riesgo no presentó un aumento en el riesgo en hombres ( $ORa=1.07$ ;  $IC95\%=0.73-1.58$ ) ni en mujeres ( $ORa=1.25$ ;  $IC95\%=0.46-3.42$ ). Tampoco se encontró aumento de riesgo en ningún grupo de edad ni por tipo histológico. No obstante, sí se encontró aumento de riesgo en el grupo de los exfumadores ( $ORa=1.97$ ;  $IC95\%=1.17-3.33$ ), como se observa en la tabla 23.

Tabla 23: Análisis estratificado de los polimorfismos p53 Arg72Pro y MDM2 SNP309

Variable	Caso/Control			OR*ajustada [IC 95%]	
	Referencia <sup>a</sup>	Moderado <sup>b</sup>	Alto <sup>c</sup>	Moderado <sup>b</sup>	Alto <sup>c</sup>
<b>Género</b>					
Hombre	163/107	307/242	184/110	0,87 [0,62-1,22]	1,07 [0,73-1,58]
Mujer	19/21	35/36	18/18	1,09 [0,45-2,65]	1,25 [0,46-3,42]
<b>Edad (años)</b>					
<55	29/26	58/69	28/34	0,77 [0,37-1,63]	0,63 [0,26-1,49]
55-69	79/50/	131/113	86/43	0,70 [0,43-1,15]	1,13 [0,63-2,04]
≥70	74/52	153/96	88/51	1,14 [0,68-1,91]	1,28 [0,72-2,26]
<b>Fumador</b>					
No fumador	10/33	21/73	12/35	0,83 [0,28-2,43]	0,98[0,29-3,34]
Fumador	172/95	321/205	190/93	0,85 [0,62-1,18]	1,19 [0,82-1,72]
Ex-fumador	68/62	147/111	96/46	1,16 [0,73-1,82]	<b>1,97 [1,17-3,33]</b>
Fumador actual	104/32	173/88	93/44	<b>0,61 [0,37-0,99]</b>	0,69 [0,40-1,21]
<b>Paquetes-año</b>					
<37	39/57	69/128	36/53	0,80 [0,47-1,37]	1,08[0,58-2,02]
≥37	133/38	251/75	154/40	0,96 [0,61-1,51]	1,18[0,71-1,98]
<b>Tipo histológico</b>					
Epidermoide	70/128	139/278	83/228	1,00 [0,66-1,54]	1,20[0,74-1,94]
Adenocarcinoma	60/128	95/278	58/228	0,72 [0,47-1,12]	0,96[0,59-1,57]
Microcítico	28/128	60/278	40/228	0,92 [0,52-1,60]	1,34[0,73-2,48]

\*Ajustado por edad, género, paquetes-año, historia familiar de cáncer de pulmón y ocupación (lista A) según corresponda

<sup>a</sup> p53 Arg/Arg y MDM2 T/T

<sup>b</sup> p53 Pro-carriers y MDM2 T/T o MDM2 G-carriers y p53 Arg/Arg

<sup>c</sup> p53 Pro-carriers y MDM2 G-carriers

**DISCUSIÓN**

En los últimos años se ha venido poniendo de manifiesto, de una forma cada vez más evidente, que los factores de riesgo medioambientales o de estilos de vida no son las únicas causas por las que un individuo presenta una mayor o menor susceptibilidad al desarrollo de un cáncer, sino que existen también factores genéticos individuales que pueden contribuir al desarrollo de esta enfermedad.

En este sentido, la intervención de los genes que controlan la correcta progresión del ciclo celular supone un punto crítico a tener en cuenta a la hora de estudiar los mecanismos por los que se desarrolla el cáncer.

Así, puesto que los genes *p21*, *p53*, *p27*, *MDM2* y *p16* están estrechamente relacionados con la progresión y parada del ciclo celular, con los procesos de apoptosis y senescencia y por ende en los mecanismos que permiten la reparación del ADN dañado o la eliminación de células con cargas genéticas aberrantes, cabe esperar que de algún modo polimorfismos presentes en estos genes puedan estar implicados en el riesgo a desarrollar cáncer.

En este trabajo se ha estudiado el efecto de los polimorfismos Ser31Arg del gen *p21*, Arg72Pro del gen *p53*, V109G del gen *p27*, 309 de *MDM2*, y G580A y C540G de *p16* en el riesgo individual a desarrollar cáncer de pulmón en una numerosa muestra de casos y controles, seleccionados en el seno de una población homogénea como es la del Principado de Asturias.

En el presente estudio se ha llevado a cabo el control pertinente de los principales factores de riesgo medioambientales, genéticos y clínicos que intervienen en el desarrollo del cáncer de pulmón con el fin de establecer una correcta medida de la asociación entre las alteraciones en los genes estudiados y el riesgo a padecer cáncer de pulmón.

Además de realizar el análisis individual de cada polimorfismo, se ha llevado a cabo el análisis conjunto de pares de polimorfismos ya que al estar relacionados en sus funciones y actuar de forma conjunta en determinadas fases del ciclo celular, resulta interesante dilucidar el efecto de la suma de la presencia de polimorfismos que potencialmente aumentan la susceptibilidad en el desarrollo del cáncer de pulmón.

### **P21**

En el caso del polimorfismo Ser31Arg del gen *p21*, nuestros resultados sugieren que dicho polimorfismo no está asociado con un aumento significativo de riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en la población general, si bien se encontró que en el grupo de los portadores del alelo Arg se apuntaba a un riesgo más elevado de cáncer de pulmón. Sin embargo, los hombres portadores del alelo Arg presentan un incremento del riesgo estadísticamente significativo, al igual que los individuos menores de 55 años, así como los fumadores, siendo destacable el aumento de riesgo para el grupo de los que consumen menos de 37 paquetes-año. Del mismo modo se encuentra un aumento de riesgo para el grupo de los que presentan un cáncer de pulmón de tipo microcítico.

En nuestro estudio, la frecuencia del alelo variante Arg es similar a la obtenida en otros estudios realizados en población caucásica. Para nuestra población, esta frecuencia alélica es 0,08 en casos y 0,07 en controles, lo que no se aleja de las obtenidas por Koopman (0,085) y Su (0,09). Sin embargo, nuestra frecuencia es algo mayor que la obtenida por Birgander y col en población sueca (0,04) y menor que la obtenida en población brasileña (0,11). Además, concuerda con la obtenida por Popanda y col. en población europea (0,07) [72-75].

La asociación entre el polimorfismo *p21* Ser31Arg y el riesgo de padecer distintos tipos de cáncer, ha sido analizada en diversos estudios con resultados dispares. En concreto este polimorfismo se ha asociado con un incremento del riesgo a desarrollar cáncer de cuello uterino, endometrio, mama y carcinoma de celular escamosas de cabeza y cuello. En relación al carcinoma del cuello uterino, el genotipo Ser/Ser aparece relacionado con un incremento del riesgo (OR=2,48), en mujeres coreanas, que aumenta al estratificar por infección por HPV (16 o 18). Esto se cree que es debido a que polimorfismos en distintos genes pueden afectar de distinta manera al proceso carcinogénico desatado por la infección con HPV [37]. Este mismo grupo realizó posteriormente un estudio en cáncer de endometrio analizando la posible relación de este polimorfismo por sí mismo y combinado con el Arg72Pro del gen *p53* con el riesgo a desarrollar este tipo de tumores, obteniendo igualmente un aumento del riesgo para el alelo Ser, así como para el alelo Pro del gen *p53* y para ambos alelos combinados [76]. En cuanto al cáncer de mama, se ha encontrado que este polimorfismo está fuertemente relacionado con los tumores negativos para el receptor de progesterona (OR=3,4), lo que sugiere que este polimorfismo podría tener alguna repercusión funcional para la vía de señalización de la progesterona en el cáncer de mama. Este estudio caso-control fue realizado en una población caucásica que incluye 267 casos y 81 controles [34]. Así mismo, en el caso del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, se ha encontrado que los portadores del alelo variante Arg presentan un mayor riesgo a desarrollar este tipo de tumores (OR=1,37), elevándose este riesgo en ex-fumadores y en ex-bebedores (OR=1,52; OR=1,91; respectivamente) [29].

En relación con el cáncer de pulmón, existen estudios con resultados contradictorios. En concordancia con nuestros resultados, Su y col. no encontraron asociación entre el polimorfismo Ser31Arg y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón en una población caucásica de 1220 casos y 1069 controles. En este estudio, encontraron además un pequeño descenso marginal en el riesgo en ex-fumadores (OR=0,69), también acorde con nuestros resultados [39]. Tampoco se ha encontrado asociación en un estudio con 155 casos y 189 controles en población taiwanesa, en el que se valora además la prognosis, encontrando que el genotipo Ser/Ser presenta una peor prognosis que aquellos genotipos portadores del alelo Arg [77]. En otro estudio incluyendo 1518 casos y 1518 controles de población caucásica tampoco se encuentra un mayor riesgo para los portadores del alelo Arg (OR=0,97; IC95%=0,70-1,35) [78]

Por el contrario, en una población sueca con 144 casos y 761 controles se encontró un aumento de riesgo a desarrollar cáncer de pulmón asociado al alelo Arg (OR=1,7), que aumenta a OR=5,2 cuando se utiliza como población control individuos aquejados de enfermedad obstructiva crónica [38].

Por otro lado, Choi y col. han publicado un estudio en el que el polimorfismo Ser31Arg aparece en fuerte desequilibrio de ligamiento con el IVS2+16G>C (rs3176352) en una población coreana. Al analizar el haplotipo en relación con la susceptibilidad al cáncer de pulmón, encuentran un efecto protector dependiente del número de alelos variantes. En este mismo trabajo, se examina el polimorfismo -2266G>A (rs4135234), situado a 5 bp del sitio de unión a p53, obteniéndose igualmente un resultado protector del polimorfismo con relación al riesgo a desarrollar cáncer de pulmón [79].

En nuestro estudio, se encuentra que no hay asociación entre el polimorfismo Ser31Arg en el gen p21 y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón al analizar nuestra población en conjunto. Sin embargo, al estratificar los datos, aparecen grupos en los que el polimorfismo Ser31Arg incrementa el riesgo: hombres, fumadores, menores de 55 años y tipo histológico microcítico.

Estos resultados difieren de los obtenidos en el estudio llevado a cabo por Sjalander y col. en población sueca (38) y coinciden con los obtenidos por Su y col. y Shih y col [77, 39]. Si bien el primero de estos dos estudios es también en población caucásica, en el segundo la población estudiada es asiática, en la que la frecuencia del alelo Arg es bastante más elevada que en los caucásicos. El efecto genético del polimorfismo p21 Ser31Arg en la susceptibilidad al cáncer podría ser diferente en diferentes grupos étnicos.

Aunque no se ha demostrado que exista una diferencia en la función de la proteína p21 como supresora del crecimiento celular [80], ni en su eficacia como inhibidora de CDKs para los distintos genotipos polimórficos, no se puede descartar que la presencia del alelo variante Arg altere otros procesos en los que está implicada esta proteína, independientes de p53 o relacionados con otros factores de transcripción [38]. De estos procesos independientes de p53, se sabe que p21 juega un papel molecular en la actividad antimetastática del gen regulado por N-myc 1 (*N-myc downstream regulated gene-1*, NDRG1), ya que se ha observado un aumento de la expresión de p21 mediada por NDRG1 en células de cáncer de próstata y de pulmón [81]. Por otro lado, la degradación de p21 mediada por MDMX puede ser revertida por 14-3-3 $\gamma$  en respuesta a daños en el ADN [82]. Es posible que existan modificaciones post-transcripcionales o post-translacionales que afecten a la función de esta proteína [77].

Se puede concluir que si bien este polimorfismo no parece ser un marcador de susceptibilidad en la población general, puede que sí pueda considerarse como tal en los grupos de población antes mencionados.

**P53**

En el caso del polimorfismo Arg72Pro de p53, no se encontró un aumento de riesgo debido a la presencia del alelo Pro en la población general. Debido a la pequeña muestra de mujeres portadoras de dicho alelo, el análisis estratificado se llevó a cabo en el grupo de los hombres, encontrándose un aumento de riesgo en los fumadores, siendo destacable en el grupo de fumadores de más de 37 paquetes-año.

Estos resultados concuerdan en parte con los encontrados en un estudio realizado en población europea, en el que se encuentra un riesgo elevado en los portadores del alelo Pro que fuman más de 20 paquetes-año (OR=1,55; IC95%=1,04-2,33) [75]. Siguiendo con el cáncer de pulmón, Liu y su grupo encontraron un aumento de riesgo para el alelo Pro, tanto en homocigotos como en heterocigotos (ORajustada=1,29; IC95%=0,9-1,8; ORajustada=1,32; IC95%=1,1-1,6 respectivamente) en un estudio que incluía 1168 casos incidentes de cáncer de pulmón y 1256 controles. En este mismo estudio se encuentra un mayor riesgo para el adenocarcinoma [83].

En un análisis conjunto publicado en 2009 donde se recopilaron datos de 32 estudios caso-control, se pudo obtener una muestra de 9.088 casos y 10.167 controles, encontrándose un aumento de riesgo tanto en heterocigotos como para homocigotos para el alelo Pro, así como en portadores del alelo Pro (OR=1,14; IC95%=1,03-1,25). Se encuentra también un mayor riesgo para el grupo de los fumadores, lo que es consistente con los resultados obtenidos en el presente estudio (OR=1,29; 95%=1,01-1,67) [84].

Estos resultados parecen refrendar el hecho de que el alelo Pro es menos eficiente en la inducción de la apoptosis [64, 85] y en la supresión de la transformación celular. El alelo Pro presenta también mayores niveles de parada del ciclo celular [65].

Además, su capacidad de formar complejos estables con p73 está disminuida lo que conlleva una pérdida de su capacidad de unión al ADN [55].

Por otro lado, el aumento del riesgo para los fumadores parece tener sentido, pues al tener p53 mermada su capacidad apoptótica, sería más fácil desarrollar cáncer al estar expuesto a la presencia de los carcinógenos presentes en el tabaco, siendo más ineficiente a la hora de contrarrestar los daños producidos por estos.

Por otro lado, se ha encontrado evidencia de que en los individuos con cáncer de pulmón que presentan el alelo Pro aparecen mutaciones somáticas en el gen p53 con más frecuencia que en los que cuentan con el alelo normal [86,87]. Este efecto también se ha observado en pacientes con tumores no microcíticos [88, 89].

Existen numerosos estudios en los que se ha tratado de esclarecer la relación del polimorfismo Arg72Pro de p53 con el desarrollo de diversos tipos de tumores. En un estudio con población europea (húngara) se encontró que la presencia del alelo Arg disminuía el desarrollo de

metaplasia intestinal [90]. Sul y colaboradores no encontraron asociación entre el alelo Pro y el riesgo a padecer cáncer gástrico, si bien al analizar la presencia de este alelo en unión con el consumo de tabaco se apreció un mayor riesgo (ORajustada=2,76; IC95%=1,03-7,39) [91].

## **P27**

El gen p27 se encuentra raramente mutado en tumores [92], si bien se han encontrado dos mutaciones del mismo en pacientes con neoplasia endocrina múltiple, una de cambio de sentido, que genera una proteína con capacidad reducida de unirse a Cdk2 e inhibir el ciclo celular y otra sin sentido cuyo producto se localiza en el citoplasma, evitando su interacción con ciclinas-Cdks, la inhibición del ciclo celular y la inducción de la apoptosis [93].

Sin embargo, existen al menos 59 polimorfismos descritos para este gen [94], de los que el más estudiado es el V109G, debido a su posible alteración funcional de la proteína, al sustituirse una valina por una glicina en una región que interacciona con otras moléculas involucradas en su degradación, por lo que posiblemente este polimorfismo conduzca a una reducción de los niveles de la proteína [95, 96].

Por este motivo, decidimos estudiar la posible implicación de este polimorfismo con el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón.

La distribución del polimorfismo en nuestra población, es de 0,26 en casos y controles para el alelo variante G, encontrándose en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2$ -HW= 0,2056; P= 0,650). Este resultado se acerca al obtenido en un meta-análisis de 2012 para población caucásica (0,232) y es algo superior de la obtenida en el mismo estudio para población asiática (0,161) [97].

En nuestro estudio, no encontramos una asociación entre el polimorfismo y un aumento del riesgo (ORa=1,17; IC95%=0,72-1,92 para homocigotos; ORa=1,01; IC95%=0,80-1,29 para homocigotos y heterocigotos-portadores del alelo G). Al hacer un análisis estratificado tampoco se encontró una relación para ninguno de los grupos.

Si bien en la literatura no se encuentran estudios de la relación de este polimorfismo con el cáncer de pulmón, sí se ha estudiado esta en estudios en cáncer de mama, próstata, páncreas y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello con resultados dispares. Así, mientras se ha encontrado asociación en hombres con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (ORa= 1.55, IC95%= 1.00–2.42) y especialmente en tumores de la cavidad oral (OR= 1.77, IC95% = 1.03–3.04) [98], en cáncer de próstata se encuentra un aumento de riesgo para los homocigotos con el alelo “normal” (OR=1.95; IC95%=1.09–3.47) [30] o no se encuentra asociación [99]. En cáncer de mama, los resultados también son dispares, encontrándose cierto efecto protector (ORa=0.70; IC95%=0.52–0.93 para heterocigotos y ORa= 0.83; IC95%=0.42–1.65 para homocigotos GG) [100] o ausencia de relación [101-103]. Tampoco aparece asociación individual

entre los individuos portadores del alelo G en el cáncer de páncreas ( $OR_{aj}=1.05$ ;  $IC95\%_{aj}=0.81-1.36$ ) [104].

### **P16**

En el presente estudio nos dispusimos a analizar dos polimorfismos del gen p16. El primero de ellos el G580A, cuya frecuencia en nuestra población es de 0,06 en casos y 0,07 en controles para el alelo A. Al ser tan pequeña esta frecuencia, agrupamos a heterocigotos y homocigotos en un solo grupo de portadores del alelo a, no encontrando asociación con cáncer de pulmón ( $OR_a=1,13$ ;  $IC95\%_a=0,79-1,62$ ). Tampoco se encontró asociación al hacer un análisis estratificado por edad, hábito tabáquico o histología.

El segundo de ellos, el C540G, cuenta con una frecuencia del alelo variante G en nuestra población de 0,18 en casos y controles. Al estudiar la relación de este polimorfismo con la susceptibilidad del cáncer de pulmón, se agruparon los heterocigotos y homocigotos portadores del alelo G, no encontrado un aumento de riesgo en los portadores del alelo G en la población general ni en el análisis estratificado.

Si bien la literatura no es extensa en cuanto a la relación de estos polimorfismos y el cáncer, aparecen algunos estudios en los que se trata de poner de manifiesto la implicación de estas variantes en el desarrollo de tumores. Así, se ha estudiado su relación con la edad de diagnóstico de cáncer de páncreas, no se encontró asociación para el caso del C540G y una asociación cercana a la significación para el C580A ( $HR=1.52$ ;  $IC95\%=1.00-2.30$ ). En el mismo estudio se encuentra que los individuos con alelo variante del polimorfismo C580A y también que eran polimórficos para Aurora-A presentaban una edad de diagnóstico 12,6 años menor a la de los pacientes con alelos salvajes, encontrándose un aumento de riesgo de diagnóstico de cáncer de páncreas a edad temprana de 3,88 para los portadores de uno o dos alelos polimórficos de estos genes [105].

Se ha observado que en individuos con melanoma metastático que presentan el polimorfismo C540G presentan una menor expresión de p53. Además, se encuentra que ambos polimorfismos de p16 se corresponden con un período más corto de tumor primario a metastático [106]. Así mismo, se ha podido observar una progresión tumoral más rápida para el alelo variante del polimorfismo C580A, de 16,2 meses a 10,8 [107].

En el caso del carcinoma escamoso de cabeza y cuello, no se ha encontrado relación entre la presencia de alelos polimórficos de las dos variantes de p16 ni por separado ni estudiando haplotipos con el riesgo de padecer este tipo de tumores [108].

Dados nuestros resultados y los obtenidos en la literatura, no parece que la presencia de estos polimorfismos por sí mismos suponga un factor a tener en cuenta en el desarrollo del cáncer, al menos en los tumores en los que se ha estudiado su papel. Sin embargo, su interacción con otros

genes relacionados con el ciclo celular, la senescencia y la apoptosis podría ser interesante a la hora de determinar haplotipos que confieran riesgo de padecer determinados tipos de cáncer.

### **MDM2**

Se ha observado que el polimorfismo 309 de *MDM2* aumenta la afinidad por el factor Sp1, y dado que este actúa como activador transcripcional, los niveles de MDM2 aumentan y en consecuencia se reduce la vía de p53 [109], lo que podría sugerir un mayor riesgo para los portadores del alelo variante de sufrir un cáncer. Debido a esto, por su importante papel en la regulación de p53, incluimos el estudio de este polimorfismo en nuestro trabajo. La frecuencia del alelo variante G en nuestra población era de 0,37 en controles y de 0,33 en casos, lo que concuerda con la resultante de un metanálisis que incluye 66 estudios, en el que la frecuencia del alelo G es 0,37 en población europea, 0,11 en la africana, y 0,50 en la asiática [110].

Al estudiar el efecto del polimorfismo en el desarrollo del cáncer de pulmón, en nuestra población G no encontramos asociación entre el alelo G y un mayor riesgo. Sin embargo, en un análisis conjunto de 66 estudios, se encontró un aumento de riesgo tanto para homocigotos GG como para heterocigotos TG (OR=1,95; IC95%=1,13-1,37; OR=1,10; IC95%=1,03-1,17) para todos los tipos de tumores. Al estratificar por tipo de tumor, se encontró mayor riesgo en el caso de los tumores de mama, cerebro, hígado, estómago y útero en individuos con el genotipo GG o GT, siendo significativo en el caso de cerebro, hígado y estómago. En el caso del cáncer de pulmón, al igual que en nuestra población, no se aprecia un aumento de riesgo significativo [110]. Tampoco se encuentra asociación entre el polimorfismo y el cáncer de pulmón en el que se incluyen 635 casos de cáncer de pulmón diagnosticados antes de los 50 años y 1300 controles caucásicos [111]. Sin embargo, en un metanálisis que incluye datos de 11 estudios caso-control de cáncer de pulmón, a pesar de no encontrarse un aumento de riesgo para la población general, sí se observa que en el grupo de no fumadores aparece un incremento de riesgo (OR=1,76; IC95%=1,36-2,29) [112]. En un estudio con 148 pacientes de cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado, se encontró que la supervivencia global era menor para los portadores del alelo G que para los homocigotos salvajes TT [113].

### **P21 Ser31Arg y P53 Arg72Pro:**

Dado que p21 es un mediador inducido por p53, consideramos interesante llevar a cabo el análisis conjunto de ambos polimorfismos con el fin de establecer la relación existente entre la presencia de alelos polimórficos de alguno de estos genes y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón. Consideramos como genotipo de riesgo moderado al que tuviera al menos un alelo de riesgo (portadores del alelo Arg de p21 y homocigotos Arg/Arg de p53 o portadores del alelo Pro de p53 y homocigotos Ser/Ser de p21), y se consideramos de alto riesgo el tener el alelo Arg de p21 y el alelo Pro de p53.

Encontramos que los hombres con el genotipo de alto riesgo presentaron un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (ORa=2.29; IC95%=1.21-4.32), especialmente en los menores de 55 años (ORa= 4.02; IC95%= 0.91-17.79). También se encontró un riesgo elevado para los fumadores (ORa= 3.61; IC95%=1.80-7.22), especialmente para los fumadores actuales (ORa=4.25; IC95%=1.41-12.82) y en el grupo de los que fuman más de 37 paquetes al año (ORa=3,52; IC95%=1,21-10,21). Finalmente, también se encontró que se incrementaba el riesgo de desarrollar carcinoma epidermoide (ORa=2.52; IC95% =1.15-5.53) y de células pequeñas (ORa= 4.22; IC95%= 1.65-10.77) en el grupo de individuos con genotipo de alto riesgo.

Esto concuerda con los resultados arrojados por otros estudios, ya que se ha visto asociación entre la presencia de alguno de los alelos polimórficos y el riesgo de cáncer de endometrio en la población coreana (ORa=2,87; IC95%=1,36-6,08 para el genotipo de riesgo y Ora=9,55; IC95%=4,30-21,24 para dos genotipo de riesgo) [114]. También en cáncer de pulmón se ha encontrado un mayor riesgo debido a la presencia de alelos variantes tanto en p53 como en p21 para el carcinoma de células escamosas y en grandes fumadores (más de 20 paquetes-año) [75]. Sin embargo, en cáncer de mama no se ha encontrado asociación entre la presencia del genotipo de variante y un mayor riesgo [115].

Puede ser que la presencia combinada de estos polimorfismos conlleve una menor respuesta apoptótica y las células dañadas por los carcinógenos presentes en el tabaco no sean eliminadas. Por el contrario, podrían acumularse mutaciones que provocaran la aparición del tumor.

En un estudio diseñado para comprobar la influencia de los polimorfismos de p53 y p21 en la expresión de p21, se encontró que la presencia de un alelo Pro de p53, al igual que la presencia de al menos un alelo Arg en p21 suponían una menor cantidad de ARNm de p21. Este efecto reductor se hacía especialmente patente cuando se consideraban ambos alelos combinados [116].

#### **P21 Ser31Arg y P27 V109G:**

Debido a su homología, decidimos estudiar el efecto combinado de los polimorfismos de p21 y p27, encontrando un aumento de riesgo para el genotipo de alto riesgo para los fumadores (ORa=3.11; IC 95% =1.14-8.47) y para el carcinoma microcítico (ORa=2.34; IC95%=1.02-5.35). No se ha encontrado en la literatura

Se ha observado que la presencia de alelos variantes en estos dos genes parece estar relacionada con una mayor probabilidad de sufrir una segunda neoplasia maligna primaria en pacientes de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello [117]. Se ha encontrado que la presencia de dos alelos variantes (uno en p21 y otro en p27) está relacionada con una edad temprana de diagnóstico de cáncer de páncreas [118]. Sin embargo, al analizar el riesgo debido a la presencia combinada de ambos polimorfismos en cáncer de páncreas no se encontró asociación, aunque sí

se encuentra riesgo al estudiar p21 estratificada por p27, obteniéndose riesgo para los homocigotos VV de p27 [119].

Debido a que el polimorfismo V109G se encuentra en una región de unión a una proteína que interviene en su degradación, la presencia del alelo variante puede conducir a alteraciones en el patrón de degradación de p27, conduciendo a que haya menores niveles de p27 [120].

#### **P53 Arg72Pro y MDM2 SNP309:**

Debido a que la regulación de p53 supone un bucle de retroalimentación negativo con MDM2, y que el polimorfismo SNP309 de MDM2 es más eficiente a la hora de disminuir los niveles de p53 [121], además de que el alelo Pro de p53 es menos eficaz en la apoptosis, puede ser más interesante estudiar la combinación de los dos polimorfismos en vez de cada uno por separado. En nuestra población, la presencia de ambos alelos variantes no supuso un mayor riesgo salvo en el caso de los exfumadores.

La presencia de los alelos MDM2GG y p53 Pro/Pro se ha visto relacionada con un mayor riesgo de cáncer de mama en población árabe [122]. También se ha encontrado mayor riesgo para la combinación del polimorfismo de MDM2 y tres polimorfismos de p53 entre los que está el Arg72Pro en cáncer de endometrio, así como para el genotipo SNP309 GG + TG y TP53 Arg/Arg [123, 124]. En un metanálisis que incluye 2.243 casos y 3.615 controles de 10 estudios caso-control, la presencia de algún alelo variante (TT-Pro/Pro, TG-Arg/Pro o GG-Pro/Pro se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular [125]. También se ha encontrado una mayor riesgo en mujeres no fumadoras chinas para el genotipo combinado p53 Pro/Pro y MDM2 GG para el adenocarcinoma de pulmón [126].

Aunque los estudios caso-control son una herramienta muy útil a la hora de identificar los posibles factores de riesgo implicados en los procesos de carcinogénesis, hay que recordar las limitaciones que presentan. Al ser nuestro estudio un diseño caso-control de base hospitalaria, no se puede descartar que el polimorfismo estudiado esté relacionado con alguna de las enfermedades seleccionadas en los controles. Sin embargo, el apareamiento de casos y controles por edad, género y residencia minimiza los factores potencialmente confusores y el posterior ajuste de los datos de análisis ayuda a eliminar las insuficiencias en el apareamiento. Hay que tener en cuenta también que la información sobre los casos y los controles se obtiene mediante entrevistas realizadas a los pacientes, lo que puede provocar un sesgo de recuerdo. Este riesgo se minimiza al realizar un cuestionario estructurado.

El cáncer de pulmón es una enfermedad compleja, y como tal, la presencia o ausencia de enfermedad es atribuible a diversos factores, como la exposición a factores medioambientales, la existencia de polimorfismos interaccionando en varios genes o las interacciones gen-ambiente.

Así, este cáncer es un claro ejemplo de enfermedad atribuible a la interacción entre genes y exposición ambiental.

Aunque el tabaco es el mayor factor de riesgo para el cáncer de pulmón, en su etiología desempeña un papel fundamental la susceptibilidad individual. Un paso importante hacia la prevención del cáncer de pulmón es la aproximación a la identificación de los factores que contribuyen a aumentar el riesgo en los individuos, así como su posible evolución, gracias a la Biología Molecular y a la Epidemiología. Este tipo de estudios serán cruciales a la hora de decidir qué polimorfismos genéticos se incluyen en futuros estudios sobre valoración de riesgo y modelos estadísticos.

En cuanto al presente trabajo, la importante colección de muestras biológicas que se ha recogido a lo largo del estudio CAPUA, sirve como punto de partida para el análisis de la contribución de los polimorfismos al desarrollo y evolución del cáncer de pulmón.

**CONCLUSIONES**

1. No se encuentra asociación entre el polimorfismo Ser31arg de p21 y el riesgo de cáncer de pulmón en la población general, pero sí en hombres, en hombres menores de 55 años y en fumadores de menos de 37 paquetes al año.
2. Aparece un mayor riesgo para los portadores del alelo Arg de p21 en los pacientes con carcinoma de células pequeñas y carcinoma de células escamosas.
3. El alelo Pro de p53 no aparece asociado a un aumento de riesgo en nuestra población.
4. Sí se asocia a un mayor riesgo en fumadores y exfumadores, así como en fumadores de más de 37 paquetes-año.
5. No se ha encontrado una asociación entre los polimorfismos V109G de p27, SNP309 de MDM2, G580A de p16 ni C540G de p16 y el riesgo de cáncer de pulmón en la población estudiada.
6. En el análisis combinado de p53 y p21, la presencia al menos un alelo de riesgo de cada gen se asocia con el riesgo de cáncer de pulmón en el subgrupo de los hombres, en los menores de 55 años, y en fumadores de más de 37 paquetes-año.
7. También se ha asociado con riesgo en el grupo de carcinoma epidermoide y en el de células pequeñas.
8. En el análisis combinado de p27 y p21, la presencia al menos un alelo de riesgo de cada gen se asocia con un aumento de riesgo para fumadores y tumores microcíticos.
9. En el análisis combinado de p53 y MDM2, la presencia al menos un alelo de riesgo de cada gen está asociado con un mayor riesgo en el grupo de los exfumadores.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Globocan 2012 [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)
2. OMS <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
3. (INE 2013)  
(<http://www.ine.es/jaxi/menu.do?type=pcaxis&path=/t15/p417&file=inebase&L=0>)
4. OMS WHO global report: Mortality attributable to tobacco use. World Health Organisation 2012.  
[http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564434\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564434_eng.pdf?ua=1)
5. International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks of chemicals to humans. Volume 83. 2004.
6. Boffetta P. Involuntary smoking and lung cancer. Scand J Work Environ Health. 2002; 28 Suppl 2:30-40.
7. Yano T, Haro A, Shikada Y, Maruyama R, Maehara Y. Non-small cell lung cancer in never smokers as a representative 'non-smoking-associated lung cancer': epidemiology and clinical features. Int J Clin Oncol. 2011 Aug;16(4):287-93.
8. Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, y col. Lung cancer incidence in never smokers. J Clin Oncol. 2007 Feb 10;25(5):472-8.
9. Tardon A, Lee WJ, Delgado-Rodriguez M, y col. Leisure-time physical activity and lung cancer: a meta-analysis. Cancer Causes Control. 2005 May;16(4): 389-97.
10. Sonnenschein C, Soto AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. Semin Cancer Biol. 2008 Oct;18(5):372-7.
11. Baker SG, Kramer BS. Paradoxes in carcinogenesis: New opportunities for research directions. BMC Cancer. 2007 Aug 6;7:151.
12. Rückert F, Sticht C, Niedergethmann M. Molecular mechanism of the "feedback loop" model of carcinogenesis. Commun Integr Biol. 2012 Sep 1;5(5):506-7.
13. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (Eds) World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Chapter 1. IARC Press. Lyon. 2004.
14. Singh CR, Kathiresan K. Molecular understanding of lung cancers-A review. Asian Pac J Trop Biomed. 2014 May;4(Suppl 1):S35-41.
15. Nelson DL, Cox MM. Bioseñalización. En su: Lehninger Principios de bioquímica. 3ª ed. Barcelona: Ind. Gráf. Ferré Olsina, S.A, 2001, cap 13, p. 474-475.
16. Bartsch H, Hietanen E. The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. Environ Health Perspect. 1996 May;104 Suppl 3:569-77.
17. Lenz HJ. The use and development of germline polymorphisms in clinical oncology. J Clin Oncol. 2004 Jul 1;22(13):2519-21.
18. Baldi A, De Luca A, Esposito V, Campioni M, Spugnini P y Citro G. Tumor Suppressors and Cell- Cycle Proteins in Lung Cancer. Patholog Res Int. 2011.
19. Ma H, Chen J, Pan S, Dai J, Jin G, Hu Z, Shen H, Shu Y. Potentially functional polymorphisms in cell cycle genes and the survival of non-small cell lung cancer in a Chinese population. Lung Cancer. 2011 Jul;73(1):32-7.
20. Nelson DL, Cox MM. Bioseñalización. En su: Lehninger Principios de bioquímica. 3ª ed. Barcelona: Ind. Gráf. Ferré Olsina, S.A, 2001, cap 13, p. 469-470.

21. Frouin I, Montecucco A, Spadari S, Maga G. DNA replication: a complex matter. *EMBO Rep.* 2003 Jul;4(7):666-70.
22. Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 1;11(11):3974-86.
23. Zhao Y1, Lou IC, Conolly RB. Computational modeling of signaling pathways mediating cell cycle checkpoint control and apoptotic responses to ionizing radiation-induced DNA damage. *Dose Response.* 2012;10(2):251-73.
24. Abbas T y Dutta A. P21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jun; 9(6): 400-414.
25. Child ES y Mann DJ. The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* 2006 Jun;5(12):1313-9.
26. Perucca P, Cazzalini O, Mortusewicz O y col. Spatiotemporal dynamics of p21CDKN1A protein recruitment to DNA-damage sites and interaction with proliferating cell nuclear antigen. *J Cell Sci.* 2006 Apr 15;119(Pt 8):1517-27.
27. Liu S, Bishop WR, Liu M. Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* 2003 Aug;6(4):183-95.
28. Gartel AL y Tyner AL. Te role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2002 Jun;1(8):639-49.
29. Li G, Liu Z, Sturgis EM, Shi Q, Chamberlain RM, Spitz MR, Wei Q. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis.* 2005 Sep;26(9):1596-602.
30. Kibel AS, Suarez BK, Belani J, Oh J, Webster R, Brophy-Ebbers M, Guo C, Catalona WJ, Picus J, Goodfellow PJ. CDKN1A and CDKN1B polymorphisms and risk of advanced prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2003 May 1;63(9):2033-6.
31. Bahl R, Arora S, Nath N, Mathur M, Shukla NK y Ralhan R. Novel polymorphism in p21(waf1/cip1) cyclin dependent kinase inhibitor gene: association with human esophageal cancer. *Oncogene.* 2000 Jan 20;19(3):323-8.
32. Ralhan R, Agarwal S, Mathur M, Wasylyk B y Srivastava A. Association between polymorphism in p21(Waf1/Cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene and human oral cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Jun;6(6):2440-7 .
33. Shi Y, Zou M, Farid NR, al-Sedairy ST. Evidence of gene deletion of p21 (WAF1/CIP1), a cyclin-dependent protein kinase inhibitor, in thyroid carcinomas. *Br J Cancer.* 1996 Nov;74(9):1336-41.
34. Powell BL, van Staveren IL, Roosken P, Grieu F, Berns EM, Iacopetta B. Associations between common polymorphisms in TP53 and p21WAF1/Cip1 and phenotypic features of breast cancer. *Carcinogenesis.* 2002 Feb;23(2):311-5.
35. Staalesen V, Knappskog S, Chrisanthar R y col. The novel p21 polymorphism p21G251A is associated with locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):6000-4.
36. Wu MT, Chen MC Y Wu DC. Influences of lifestyle habits and p53 codon 72 and p21 codon 31 polymorphisms on gastric cancer risk in Taiwan. *Cancer Lett.* 2004 Mar 8;205(1):61-8.

37. Roh J, Kim M, Kim J, Park N, Song Y, Kang S y Lee H. Polymorphisms in codon 31 of p21 and cervical cancer susceptibility in Korean women. *Cancer Lett.* 2001 Apr 10;165(1):59-62.
38. Sjölander A, Birgander R, Rannug A, Alexandrie AK, Tornling G, Beckman G. Association between the p21 codon 31 A1 (arg) allele and lung cancer. *Hum Hered.* 1996 Jul-Aug;46(4):221-5.
39. Su L, Liu G, Zhou W, Xu LL, Miller DP, Park S, Lynch TJ, Wain JC, Christiani DC. No association between the p21 codon 31 serine-arginine polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Feb; 12(2):174-5.
40. Borriello A, Cucciolla V, Oliva A, Zappia V, Della Ragione F. p27Kip1 metabolism: a fascinating labyrinth. *Cell Cycle.* 2007 May 2;6(9):1053-61.
41. Marinoni I, Pellegata N S. p27kip1: A New Multiple Endocrine Neoplasia Gene? *Neuroendocrinology* 2011; 93:19–28
42. Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med.* 2009 Nov 30; 41(11):765-71.
43. Vervoorts J, Lüscher B. Post-translational regulation of the tumor suppressor p27KIP1. *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3255 – 3264.
44. Pasquali D, Circelli L, Faggiano A, y col. CDKN1B V109G polymorphism a new prognostic factor in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2011 Mar; 164(3):397-404.
45. Thakur N, Hussain S, Nasare V, Das BC, Basir SF, Bharadwaj M. Association analysis of p16 (CDKN2A) and RB1 polymorphisms with susceptibility to cervical cancer in Indian population. *Mol Biol Rep.* 2012 Jan;39(1):407-14.
46. Pei XH, Xiong Y. Biochemical and cellular mechanisms of mammalian CDK inhibitors: a few unresolved issues. *Oncogene.* 2005 Apr 18;24(17):2787-95.
47. Overhoff MG, Garbe JC, Koh J, Stampfer MR, Beach DH y Bishop CL. Cellular senescence mediated by p16INK4A-coupled miRNA pathways. *Nucleic Acids Res.* 2014 Feb; 42(3):1606-18.
48. McLaughlin-Drubin ME1, Park D, Munger K. Tumor suppressor p16INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Oct 1; 110(40):16175-80.
49. Burd CE, Sorrentino JA, Clark KS, y col. Monitoring tumorigenesis and senescence in vivo with a p16(INK4a)-luciferase model. *Cell.* 2013 Jan 17; 152(1-2):340-51.
50. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM y col. Haplotypes of two variants in p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) exon 3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Jul;11(7):640-5.
51. Iwakuma T, Lozano G. MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res.* 2003 Dec;1(14):993-1000.
52. Manfredi JJ. The Mdm2-p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. *Genes Dev.* 2010 Aug 1;24(15):1580-9.
53. Deb SP. Cell cycle regulatory functions of the human oncoprotein MDM2. *Mol Cancer Res.* 2003 Dec;1(14):1009-16.
54. Knappskog S, Gansmo LB, Romundstad P y col. *MDM2* promoter SNP344T>A (rs1196333) status does not affect cancer risk. *PLoS One.* 2012;7(4):e36263.

55. Robles AI, Linke SP, Harris CC. The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene*. 2002 Oct 7;21(45):6898-907.
56. Levine AJ y Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009 October ; 9(10): 749–758.
57. Vita M. Golubovskaya y William G. Cance. Targeting the p53 Pathway. *Surg Oncol Clin N Am*. 2013 October ; 22(4).
58. Lee CL, Blum JM y Kirsch DG. Role of p53 in regulating tissue response to radiation by mechanisms independent of apoptosis. *Transl Cancer Res*. 2013 October ; 2(5): 412–421.
59. Woods DB y Vousden KH. Regulation of p53 function. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):56-66.
60. Elkholi R y Chipuk JE. How do I kill thee? Let me count the ways: p53 regulates PARP-1 dependent necrosis. *Bioessays*. 2014 January; 36(1): 46–51.
61. Schabath MB, Wu X, Wei Q, Li G, Gu J, Spitz MR. Combined effects of the p53 and p73 polymorphisms on lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Jan;15(1):158-61.
62. Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, Kadlubar FF, Spitz MR. p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J Natl Cancer Inst*. 2002 May 1;94(9):681-90.
63. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. TP53 polymorphisms and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Mutagenesis*. 2003 Jul;18(4):377-85. Review.
64. Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L y Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*. 1999 Feb;19(2):1092-100.
65. Pim D y Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int. J. Cancer*. 2004 Jan 10;108(2):196-9.
66. Siddique M y Sabapathy K. Trp-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene*. 2006 Jun 15;25(25):3489-500.
67. Dai S, Mao C, Jiang L, Wang G, Cheng H. P53 polymorphism and lung cancer susceptibility: a pooled analysis of 32 case-control studies. *Hum Genet*. 2009 Jun;125(5-6):633-8.
68. Fernández-Rubio A, López-Cima MF, González-Arriaga P, García-Castro L, Pascual T, Marrón MG, Tardón A. The TP53 Arg72Pro polymorphism and lung cancer risk in a population of Northern Spain. *Lung Cancer*. 2008 Sep;61(3):309-16.
69. Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
70. Kleinbaum, D. G., D. G. y M. Klein 2002. *Logistic regression: a self-learning text*. New York, NY, Springer.
71. Oeth P, Beaulieu M, Park C y col. iPLEX™ Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. SEQUENOMR Application Note. 2005.
72. Koopmann J, Maintz D, Schild S y col. Multiple polymorphisms, but no mutations, in the WAF1/CIP1 gene in human brain tumours. *Br J Cancer*. 1995 Nov;72(5):1230-3.

73. Birgander R, Sjölander A, Saha N, Spitsyn V, Beckman L y Beckman G. The codon 31 polymorphism of the p53-inducible gene p21 shows distinct differences between major ethnic groups. *Hum Hered.* 1996 May-Jun;46(3):148-54.
74. Rodrigues FC, Kawasaki-Oyama RS, Fo JF y col. Analysis of CDKN1A polymorphisms: markers of cancer susceptibility? *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Apr 15;142(2):92-8.
75. Popanda O, Edler L, Waas P y col. Elevated risk of squamous-cell carcinoma of the lung in heavy smokers carrying the variant alleles of the TP53 Arg72Pro and p21 Ser31Arg polymorphisms. *Lung Cancer.* 2007 Jan;55(1):25-34.
76. Roh JW, Kim JW, Park NH y col. p53 and p21 genetic polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2004 May;93(2):499-505.
77. Shih CM, Lin PT, Wang HC, Huang WC y Wang YC. Lack of evidence of association of p21WAF1/CIP1 polymorphism with lung cancer susceptibility and prognosis in Taiwan. *Jpn J Cancer Res.* 2000 Jan;91(1):9-15.
78. Wang W, Spitz MR, Yang H, Lu C, Stewart DJ y Wu X. Genetic variants in cell cycle control pathway confer susceptibility to lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Oct 1;13(19):5974-81.
79. Choi YY, Kang HK, Choi JE y col. Comprehensive assessment of P21 polymorphisms and lung cancer risk. *J Hum Genet.* 2008;53(1):87-95.
80. Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene.* 1994 Oct;9(10):3021-4.
81. Kovacevic K, Sivagurunathan S, Mangs H, Chikhani S, Zhang D y Richardson DR. The metastasis suppressor, N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), upregulates p21 via p53-independent mechanisms. *Carcinogenesis.* 2011 May;32(5):732-40.
82. Lee JH y Lu H. 14-3-3 $\gamma$  inhibition of MDMX-mediated p21 turnover independent of p53. *J Biol Chem.* 2011 Feb 18;286(7):5136-42.
83. Liu G, Miller DP, Zhou W y col. Differential association of the codon 72 p53 and GSTM1 polymorphisms on histological subtype of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8718-22.
84. Dai S, Mao C, Jiang L, Wang G y Cheng H. P53 polymorphism and lung cancer susceptibility: a pooled analysis of 32 case-control studies. *Hum Genet* (2009) 125:633-638.
85. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3<sup>rd</sup>, Georgr DL, Murphy M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet.* 2003 Mar;33(3):357-65.
86. Mechanic LE, Marrogi AJ, Welsh JA y col. Polymorphisms in XPD and TP53 and mutation in human lung cancer. *Carcinogenesis.* 2005 Mar;26(3):597-604.
87. Mechanic LE, Bowman ED, Welsh JA y col. Common genetic variation in TP53 is associated with lung cancer risk and prognosis in African Americans and somatic mutations in lung tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Feb;16(2):214-22.
88. Hu Y, McDermott MP y Ahrendt A. The p53 codon 72 proline allele is associated with p53 gene mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Apr 1;11(7):2502-9.

89. Szymanowska A, Jassem E, Dziadziuszko R y col. Increased risk of non-small cell lung cancer and frequency of somatic TP53 gene mutations in Pro72 carriers of TP53 Arg72Pro polymorphism. *Lung Cancer* 2006 Apr;52(1):9-14.
90. Szoke D, Molnár B, Solymosi N y col. The RR genotype of codon 72 of p53 gene reduces the development of intestinal metaplasia. *Dig Liver Dis.* 2009 Mar;41(3):179-84.
91. Sul J, Yu GP, Lu QY y col. P53 Codon 72 polymorphisms: A case-control study of gastric cancer and potential interactions. *Cancer Lett.* 2006 Jul 18;238(2):210-23.
92. Kawamata N, Morosetti R, Miller CW y col. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res.* 1995 Jun 1;55(11):2266-9.
93. Molatore S, Marinoni I, Lee M y col. A Novel Germline *CDKN1B* Mutation Causing Multiple Endocrine Tumors: Clinical, Genetic and Functional Characterization. *Hum Mutat.* 2010 November; 31(11): E1825–E1835.
94. dbSNPdatabase [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)
95. Tomoda K, Kubota Y, Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27 is instigated by Jab1. *Nature* 1999;398:160.
96. Teng EC, Todd LR, Ribar TJ, y col. Gfer inhibits Jab1-mediated degradation of p27 to restrict proliferation of hematopoietic stem cells. *Mol Biol Cell* 2011;22:1312.
97. Wei F, Xu J, Tang L y col. p27Kip1 V109G Polymorphism and Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Biother Radiopharm* 2012 Dec;27(10):665-71.
98. Li G, Sturgis EM, Wang LE, et al. Association between the V109G polymorphism of the p27 gene and the risk and progression of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:3996.
99. Huang SP, Yu CC, Liu CC, et al. CDKN1B V109G polymorphism frequency and prostate cancer risk in Taiwan. *Urol Int* 2008;81:36.
100. Figueiredo JC, Knight JA, Cho S, et al. Polymorphisms cMyc-N11S and p27-V109G and breast cancer risk and prognosis. *BMC Cancer* 2007;7:99.
101. Naidu R, Har YC, Taib NA. P27 V109G Polymorphism is associated with lymph node metastases but not with increased risk of breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2007; 26:133.
102. Ma H, Jin G, Zhai X, et al. Variant genotypes of CDKN1A and CDKN1B are associated with an increased risk of breast cancer in Chinese women. *Int J Cancer* 2006;119: 2173.
103. Onay VU, Briollais L, Knight JA, et al. SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. *BMC Cancer* 2006;6:114.
104. Chen J, Amos CI, Merriman KW, et al. Genetic variants of p21 and p27 and pancreatic cancer risk in non-Hispanic Whites: A case-control study. *Pancreas* 2010;39:1.
105. Chen J, Li D, Wei C, y col. Aurora-A and p16 polymorphisms contribute to an earlier age at diagnosis of pancreatic cancer in Caucasians. *Clin Cancer Res* 2007 May 15;13(10):3100-4.
106. Sauroja I, Smeds J, Vlaykova T. Analysis of G(1)/S checkpoint regulators in metastatic melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2000 Aug;28(4):404-14.

107. Chen, Li D, Killary AM, y col. Polymorphisms of p16, p27, p73, and MDM2 modulate response and survival of pancreatic cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Ann Surg Oncol*. 2009 Feb;16(2):431-9.
108. Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, y col. Haplotypes of two variants in p16 (CDKN2/MTS-1/INK4a) exon 3 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Jul;11(7):640-5.
109. Bond GL, Hu W, Bond EE y col. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell*. 2004 Nov 24;119(5):591-602.
110. Wan W, Wu W, Yin Z, Guan P, Zhou B. MDM2 SNP309, gene-gene interaction, and tumor susceptibility: an updated meta-analysis. *BMC Cancer*. 2011 May 29;11:208.
111. Mittelstrass K, Sauter W, Rosenberger A, y col. Early onset lung cancer, cigarette smoking and the SNP309 of the murine double minute-2 (MDM2) gene. *BMC Cancer*. 2008 Apr 23;8:113.
112. Zhuo W, Zhang L, Zhu B, Ling J, Chen Z. Association of MDM2 SNP309 variation with lung cancer risk: evidence from 7196 cases and 8456 controls. *PLoS One*. 2012;7(7):e41546.
113. Han JY, Lee GK, Jang DH, Lee SY, Lee JS. Association of p53 codon 72 polymorphism and MDM2 SNP309 with clinical outcome of advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2008 Aug 15;113(4):799-807.
114. Roh JW1, Kim JW, Park NH, y col. p53 and p21 genetic polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2004 May;93(2):499-505.
115. Keshava C, Frye BL, Wolff MS, McCanlies EC y Weston A. Waf-1 (p21) and p53 polymorphisms in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 Jan;11(1):127-30.
116. Su L, Sai Y, Fan R, y col. P53 (codon 72) and P21 (codon 31) polymorphisms alter in vivo mRNA expression of p21. *Lung Cancer*. 2003 Jun;40(3):259-66.
117. Wang Z, Sturgis EM, Zhang F, y col. Genetic variants of p27 and p21 as predictors for risk of second primary malignancy in patients with index squamous cell carcinoma of head and neck. *Mol Cancer*. 2012 Mar 26;11:17
118. Chen J, Killary AM, Sen S, y col. Polymorphisms of p21 and p27 jointly contribute to an earlier age at diagnosis of pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2008 Dec 8;272(1):32-9.
119. Chen J, Amos CI, Merriman KW, y col. Genetic variants of p21 and p27 and pancreatic cancer risk in non-Hispanic Whites: a case-control study. *Pancreas*. 2010 Jan;39(1):1-4.
120. Tomoda K., Kubota Y., Kato J. Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature (Lond.)*1999 398:160-165.
121. Javid J, Mir R, Julka PK, Ray PC, Saxena A. Association of p53 and mdm2 in the development and progression of non-small cell lung cancer. *Tumour Biol*. 2015 Feb 12.
122. Alshatwi AA, Hasan TN, Shafi G, Alsaif MA, Al-Hazzani AA, Alsaif AA. A single-nucleotide polymorphism in the TP53 and MDM-2 gene modifies breast cancer risk in an ethnic Arab population. *Fundam Clin Pharmacol*. 2012 Jun;26(3):438-43.

123. Ashton KA1, Proietto A, Otton G, y col. Polymorphisms in TP53 and MDM2 combined are associated with high grade endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2009 Apr;113(1):109-14.
124. Yoneda T, Kuboyama A, Kato K, y col. Association of MDM2 SNP309 and TP53 Arg72Pro polymorphisms with risk of endometrial cancer. *Oncol Rep.* 2013 Jul;30(1):25-34.
125. Peng Q, Lao X, Chen Z,y col. TP53 and MDM2 gene polymorphisms, gene-gene interaction, and hepatocellular carcinoma risk: evidence from an updated meta-analysis. *PLoS One.* 2013 Dec 23;8(12):e82773.
126. Ren YW, Yin ZH, Wan Y, y col. P53 Arg72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms cooperate to increase lung adenocarcinoma risk in Chinese female non-smokers: a case control study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):5415-20.

**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 ulceronecrotica 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, recurrentee
- 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: íleo de calculo biliar 560.31, íleo 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 recto 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 esfínter 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: linfagitis 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 eczematoides 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 variegada 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 Estrias 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 Anomalidades 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 rosáceas 695.3
  - 706.2 Quiste sebáceo
  - 706.3 Seborrea Excluye: queratosis seborreíca 702, seborrea: de la cabez 704.8, seca 690
  - 706.8 Otras enfermedades especificadas de glándulas sebaceas
  - 706:9 Enfermedad no especificada de glándulas sebaceas
- 708 Urticaria Excluye: anmgioedema hereditario 277.6, edema: angioneurótico 995.1, de Quinke 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 frio 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 carotida
- 900.1 Vena yugular interna
- 900.8 Otros
- 900.9 Sin especificación
- 901.0 Aorta Torácica
- 901.1 Tronco Braquiocefalico y arteria subclavias
- 901.2 Vena Cava Superior
- 901.3 Vena Subclavias y tronco Braquiocefalico venoso
- 901.4 Vaso sanguineo pulmonar
- 901.8 Otros
- 901.9 Sin expecificacion
- 902.0 Aorta abdominal
- 902.1 Vena Cava Inferior, ( venas hepaticas)
- 902.2 Tronco Celiaco y arterias Mesentericas
- 902.3 Porta y Esplenica
- 902.4 Vasos Sanguineos renales
- 902.5 Vasos sanguineos Iliacos
- 902.8 Otros, multiples vasos sanguíneos del abdomen y de la pelvis
- 902.9 Sin especificación
- 903.0 Vasos Sanguineos axilares
- 903.1 Vasos sanguineos braquiales
- 903.2 Vasos Sanguineos radiales
- 903.3 Vasos Sanguineos 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 popliteos
- 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: region 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 múltiples.  
Excluye: Sitios múltiples clasificables en la misma categoría de tres dígitos (910-918)
- 920 Contusión de la cara, del cuero cabelludo y del cuello, excepto los ojos
- 921 Contusión de los ojos y sus anexos
- 921.0 Equimosis ocular
- 921.1 Contusión de los párpados y de la región periocular
- 921.2 Contusión 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 tórax
- 922.2 Pared del abdomen
- 922.3 Dorso. Excluye: región escapular (923.0)
- 922.4 Órganos genitales
- 922.8 Sitios múltiples 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 múltiples 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 múltiples del miembro inferior

924.5 Parte no especificada del miembro inferior

924.8 Sitios múltiples no clasificados en otra parte

924.9 Sitio no especificado

Magulladuras (925-929)

Excluye: Concusión (850)

Magulladura:

De órganos 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 órganos internos (860-869)

926.0 Genitales externos

926.1 Otros especificados

Excluye: Magulladura del torax (862.-)

926.8 Sitios múltiples 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: afectos 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:

Sí                      No

Entrevista *f f*

Muestras biológicas *f f*

Acceso al historial médico *f f*

Nombre y apellidos Firma  
del participante.

D./Dña

---

Nombre y apellidos Firma  
del Dr./Dra. que solicita el consentimiento

Dr./Dra.

---

Fecha: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Apreciamos sinceramente su cooperación en este proyecto de investigación.

## ANEXO III: IDC (Impreso de datos clínicos)

IDC PACIENTE

## PROTOCOLO DE NEOPLASIA BRONCOPULMONAR

## Datos básicos del paciente:

APELLIDOS: \_\_\_\_\_  
 NOMBRE: \_\_\_\_\_  
 DIRECCIÓN: \_\_\_\_\_  
 POBLACIÓN: \_\_\_\_\_  
 TELEFONO: \_\_\_\_\_  
 N°PROTOCOLO: \_\_\_\_\_  
 N°HISTORIA: \_\_\_\_\_  
 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. Diagnostico: 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. N° 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. \_\_\_\_\_