

Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad Nacional de Quilmes  
con Mención en Ciencias Básicas y Aplicadas

**ROL DEL SISTEMA CIRCADIANO, EL SISTEMA DE METABOLIZACIÓN DE  
XENOBIÓTICOS Y LOS HáBITOS DE CONSUMO EN EL RIESGO DE  
CÁNCER Y EL DESARROLLO TUMORAL**

**ESTUDIOS EN PACIENTES ONCOLÓGICOS Y EN UN MODELO MURINO  
DE TUMORIGÉNESIS EXPERIMENTAL**

*Lic. María Belén Cerliani*

Directora: Dra. Silvina Richard

Co-Director: Dr. Juan José Chiesa

Tutora: Dra. Giselle Ripoll

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE)  
CIC-CONICET-UNLP  
La Plata, Buenos Aires  
2016



Tarda en llegar  
al final, al final

ay recompensa”

(Zona de promesas, Gustavo Cerati)

na de promesas, Gustavo Cerati

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral es fruto del trabajo y el acompañamiento de muchísimas personas. Ciertamente el camino no ha sido fácil, pero -como dice la canción-, hay recompensa, y ésta ha venido en forma de aprendizaje, crecimiento, nuevos vínculos, y por supuesto, la tesis que acá presento.

De forma muy breve, pero con mucho cariño y aprecio, quisiera agradecerle a las siguientes personas, grupos e instituciones que han colaborado conmigo y con este trabajo:

Al laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE, a mi directora Silvina, y los demás investigadores, personal de apoyo y becarios con quienes transité estos años de formación.

Al laboratorio de Cronobiología de la UNQ, en especial a Juan, Natalia y Malena, por su imprescindible ayuda.

A Giselle, mi tutora, gracias por acompañarme en este último tramo.

A los médicos, técnicos y administrativos del Hospital Prof. Dr. Rossi, profesionales ejemplares y con fuerte vocación de servicio.

A los pacientes que amablemente participaron de este estudio, especialmente a aquellos que me acompañaron en mis tareas dentro del hospital, y a sus familias.

Al Dr. von Arx del Comité de Ética del Hospital San Roque de Gonnet.

Al laboratorio de Epidemiología Genética del CEMIC, en especial a Hebe, Jorge y Juan.

Al laboratorio de Genética Molecular de Poblaciones y de Neuroendocrinología del IMBICE, por su soporte técnico-académico-emocional.

A los becarios y ex-becarios del IMBICE, compañeros del día a día, en la mesada, la oficina y la vida afuera del laboratorio.

A todos los que, de alguna manera, me facilitaron un contacto, una técnica, un trámite, me dieron un punto de vista o una posible solución para avanzar con mi trabajo.

A mis amistades, de acá, de allá y de un poco más allá... chin chin por la amistad que no conoce de límites geográficos o temporales.

A mi familia, que hace tiempo me dejó volar pero sigue ahí, compartiendo mis proyectos, firme, como un bastón donde apoyarme.

A mi esposo, que también se doctora, pero en “acompañamiento y sostén de la doctoranda”. Gracias infinitas. Por nuevos proyectos juntos.

Al CONICET y a la Universidad pública y gratuita<sup>a</sup>.

A Dios, y sus caminos.

---

<sup>a</sup> Al momento de redactar estos agradecimientos, el MinCyT y varios CCT del país se encontraban en toma pacífica, con movilización y asambleas generales permanentes, como medidas de lucha frente a la disminución en el número de ingresos a CIC y recorte presupuestario para 2017. *“Los países ricos lo son porque dedican dinero al desarrollo científico-tecnológico, y los países pobres lo siguen siendo porque no lo hacen. La ciencia no es cara, cara es la ignorancia”.* Bernardo Houssay.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	12
ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN.....	17
CÁNCER.....	18
Generalidades del desarrollo tumoral.....	18
Aspectos genéticos del cáncer.....	18
Inestabilidad genómica.....	20
El rol de los polimorfismos.....	20
La genética como herramienta.....	21
Diagnóstico y tratamiento del cáncer.....	22
Factores de riesgo.....	22
Aspectos relativos a la psico-oncología del cáncer.....	23
Cáncer hematológico.....	25
Neoplasias mieloproliferativas crónicas.....	25
Leucemias agudas.....	25
Síndromes linfoproliferativos.....	26
Linfoma no-Hodgkin.....	26
Linfoma de Hodgkin.....	27
Gammapatías monoclonales.....	27
ENZIMAS METABOLIZANTES DE XENOBIÓTICOS.....	28
Generalidades del sistema de metabolización de xenobióticos.....	28
Enzimas Metabolizantes de Xenobióticos.....	29
Polimorfismos de GMX. Correlación genotipo-capacidad metabólica.....	30
Citocromo P450.....	32
Polimorfismos.....	33
Glutación S-transferasas.....	34
Polimorfismos.....	35
RITMO CIRCADIANO.....	36
Generalidades.....	36
Componentes del reloj circadiano.....	37

El mecanismo molecular del reloj.....	39
El control post-transcripcional.....	42
La interrupción del sistema circadiano y el cáncer.....	42
Protocolo de desincronización forzada por <i>jet lag</i> crónico en un modelo animal .....	43
El reloj circadiano, el control del ciclo celular y la respuesta frente al daño al ADN.....	45
RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE METABOLIZACIÓN DE XENOBIÓTICOS Y EL RELOJ CIRCADIANO EN EL DESARROLLO TUMORAL.....	51
Rutas moleculares.....	51
Perturbación del reloj por compuestos xenobióticos.....	53
Sistema de EMX + tiempo = heterogeneidad en la respuesta a los xenobióticos.....	54
HIPÓTESIS.....	56
OBJETIVOS.....	57
PARTE I: INTERACCIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE EL SISTEMA CIRCADIANO Y EL PROCESO TUMORAL.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	60
Modelo animal.....	60
Línea celular para la tumorigénesis.....	61
Muestras biológicas.....	61
Síntesis de ADNc.....	63
Reacciones de qPCR.....	63
Análisis estadístico.....	64
RESULTADOS.....	65
Desincronización circadiana en genes reloj y GMX por <i>jet lag</i> crónico.....	65
Alteraciones circadianas inducidas por el tumor.....	66
Desincronización circadiana y desarrollo tumoral.....	68
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES PARCIALES.....	77

PARTE II: ASOCIACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES ONCO- HEMATOLÓGICAS Y LOS POLIMORFISMOS DE GENES RELOJ Y GMX, FUNCIONALIDAD DEL PACIENTE, HÁBITOS DIETARIOS, Y TABAQUISMO.....	78
MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
Diseño de estudio caso-control.....	79
Aspectos bioéticos.....	79
Reclutamiento.....	79
Encuestas.....	80
Muestras biológicas.....	80
Genotipado por PCR y PCR-RFLP.....	81
Genotipado de <i>PER3</i> .....	81
Genotipado de <i>GSTT1/GSTM1</i> .....	83
Genotipado de <i>CYP1A1*2A</i> .....	84
Análisis estadístico.....	85
RESULTADOS.....	86
Resultados generales respecto de la población en estudio.....	86
Análisis de asociación entre el polimorfismo de <i>PER3</i> , variables de funcionalidad y las enfermedades onco-hematológicas.....	86
Polimorfismo VNTR de <i>PER3</i> y enfermedades onco- hematológicas.....	86
Funcionalidad y enfermedades onco-hematológicas.....	87
Interacción entre genotipos de <i>PER3</i> y funcionalidad.....	87
Análisis de asociación entre tabaco, hábitos dietarios, polimorfismos de GMX y las enfermedades onco- hematológicas.....	87
Tabaco, hábitos dietarios y enfermedades onco- hematológicas.....	87
Polimorfismos en GMX y enfermedades onco-hematológicas	88
Interacción entre GMX, tabaco y hábitos dietarios.....	89
DISCUSIÓN.....	94
Análisis de asociación entre el polimorfismo de <i>PER3</i> , variables de funcionalidad y las enfermedades onco-hematológicas.....	94

---

Análisis de asociación entre tabaco, hábitos dietarios, polimorfismos de GMX y las enfermedades onco- hematológicas.....	97
Respecto de los diseños caso-control.....	104
CONCLUSIONES PARCIALES.....	106
CONSIDERACIONES FINALES.....	107
PUBLICACIONES A PARTIR DE ESTA TESIS DOCTORAL.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	111
ANEXO.....	128

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Contribuciones de cada EMX al metabolismo de fase I y II.....	30
<i>Figura 2:</i> Factores endógenos y exógenos que, en interacción con la constitución genética, contribuyen a la variación en la respuesta a xenobióticos.....	32
<i>Figura 3:</i> Componentes del sistema circadiano.....	38
<i>Figura 4:</i> Representación esquemática del sistema circadiano.....	39
<i>Figura 5:</i> Principales bucles de retroalimentación a nivel transcripcional/traducciona l en el reloj circadiano de los mamíferos.....	41
<i>Figura 6:</i> Caracterización del crecimiento tumoral en condiciones de LO (luz-oscuridad) y JLC.....	44
<i>Figura 7:</i> Control de la proliferación celular y la apoptosis a nivel sistémico, por parte del reloj circadiano.....	46
<i>Figura 8:</i> Rutas de señalización entre el reloj circadiano y la regulación del ciclo celular en tejidos periféricos.....	47
<i>Figura 9:</i> Uniones identificadas entre el reloj circadiano mamífero y las rutas del ciclo celular.....	48
<i>Figura 10:</i> Interacciones entre las proteínas reloj, y los reguladores del ciclo celular y la respuesta al daño al ADN.....	49
<i>Figura 11:</i> El reloj circadiano regula una cascada de expresión génica coordinada temporalmente, que es necesaria para la adecuada respuesta frente a los xenobióticos.....	52
<i>Figura 12:</i> Maquinaria molecular del reloj y su interrelación con la exposición a xenobióticos.....	53
<i>Figura 13:</i> Esquemas de iluminación utilizados.....	61
<i>Figura 14:</i> Expresión relativa de ARNm de <i>Bmal1</i> en tejido correspondiente a los NSQ (LD ST), y de <i>Bmal1</i> , <i>Per1</i> , <i>Nat1</i> , <i>Gstt1</i> y <i>Cyp1a1</i> en tejido hepático de animales sanos bajo LD 12:12 o bajo JL (LD ST y JL ST).....	66

---

<i>Figura 15:</i> Expresión relativa de ARNm de <i>Bmal1</i> en NSQ, y <i>Bmal1</i> , <i>Gstt1</i> , <i>Nat1</i> y <i>Cyp1a1</i> en tejido hepático de animales bajo condición LD 12:12, sin tumor y con tumor (LD ST y LD CT).....	67
<i>Figura 16:</i> Expresión relativa de ARNm de <i>Bmal1</i> , <i>Gstt1</i> , <i>Nat1</i> y <i>Cyp1a1</i> en tejido hepático de animales con tumores bajo LD y JL.....	68
<i>Figura 17:</i> Expresión relativa de ARNm de <i>Bmal1</i> , <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Gstt1</i> , <i>Nat1</i> y <i>Cyp1a1</i> en tejido tumoral de animales bajo condición LD o JL.....	69
<i>Figura 18:</i> Visualización de los productos de amplificación por PCR del polimorfismo VNTR del gen <i>PER3</i> , mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con Gel Red.....	82
<i>Figura 19:</i> Visualización de los productos de amplificación por PCR multiplex de <i>GSTT1</i> , <i>GSTM1</i> y <i>CLOCK</i> , mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con Gel Red.....	84
<i>Figura 20:</i> Visualización de los productos de PCR-RFLP para <i>CYP1A1</i> , utilizando la enzima <i>MspI</i> , mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con Gel Red.....	85

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<i>Tabla 1:</i> Características demográficas de la población en estudio.....	90
<i>Tabla 2:</i> Asociación entre el polimorfismo de <i>PER3</i> y las enfermedades onco-hematológicas. También se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas para el VNTR.....	90
<i>Tabla 3:</i> Asociación entre las variables de funcionalidad y las enfermedades onco-hematológicas.....	91
<i>Tabla 4:</i> Distribución de genotipos de <i>PER3</i> entre casos y controles, y su asociación con las variables de funcionalidad.....	92
<i>Tabla 5:</i> Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo <i>CYP1A1 *2A</i> , y las deleciones de <i>GSTT1/GSTM1</i> .....	93
<i>Tabla 6:</i> Asociación entre el tabaco, los hábitos dietarios, los polimorfismos en <i>GMX</i> y las enfermedades onco-hematológicas.....	93

## RESUMEN

El cáncer hematológico es un grupo de enfermedades que afectan el normal funcionamiento de las células sanguíneas. Al igual que otros tipos de cáncer, sus células presentan inmortalidad replicativa, inestabilidad genómica, alteraciones en el metabolismo, capacidad de invadir otros tejidos y de evadir la respuesta inmune. La susceptibilidad al cáncer, su desarrollo y progresión dependen tanto de factores genéticos como ambientales.

Los procesos de metabolización y detoxificación de sustancias endógenas y exógenas son llevados a cabo por un conjunto de familias de enzimas metabolizantes de xenobióticos (EMX). Tanto las variantes alélicas en los genes metabolizantes de xenobióticos (GMX), como los niveles de exposición a los sustratos de estas enzimas, pueden impactar en la susceptibilidad al cáncer. De hecho, polimorfismos en los GMX se encontraron asociados a diversos tumores.

La fisiología rítmica con una periodicidad cercana a las 24 horas está coordinada, en los mamíferos, por un reloj central localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo, cuya función es mantener una homeostasis diaria en los procesos vitales. También existen relojes circadianos en muchos órganos periféricos. Los genes reloj (aquellos implicados en el funcionamiento del reloj circadiano) actuarían como supresores de tumores a través de su participación en la proliferación celular, la apoptosis, el control del ciclo celular y la respuesta al daño al ADN; variantes alélicas en estos genes se asociaron a distintos tipos de cáncer. Además, la Organización Mundial de la Salud clasificó al trabajo en turno rotativo con interrupción del ritmo circadiano como factor de riesgo para el cáncer. En relación al sistema de metabolización, la manera en que funciona el reloj circadiano es fundamental para definir la respuesta individual frente a la exposición a xenobióticos, en tanto las EMX se encuentran bajo el control del marcapasos circadiano.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la relación entre el sistema circadiano, el sistema de metabolización de xenobióticos, los hábitos de consumo y la funcionalidad del paciente, en el riesgo de cáncer y el desarrollo tumoral. Para ello, se analizaron los patrones de expresión de genes reloj y GMX en un modelo animal de tumorigénesis, bajo condiciones normales o de

desincronización circadiana. Por otro lado, se evaluó la asociación entre las enfermedades onco-hematológicas (EOH) y variantes alélicas de estos mismos genes, hábitos dietarios, tabaquismo y funcionalidad del paciente, a través de un diseño caso-control.

Para el modelo animal, se utilizaron ratones C57BL/6, inoculados con una línea celular tumoral de melanoma y sus respectivos controles, sometidos a condiciones normales de luz-oscuridad (LD, *light-dark*, 12h:12h) o a un protocolo de desincronización forzada por *jet lag* crónico (JL, consistente en un avance de 6 h en el ciclo LD, cada dos días). Utilizando RT-qPCR, se midió expresión relativa de ARNm de los genes reloj *Bmal1*, *Per1* y *Per2*, y de los GMX *Gstt1*, *Nat1* y *Cyp1a1*, en tejido proveniente de los NSQ, hígado y tumor. Respecto de *Bmal1*, los resultados obtenidos bajo condiciones de iluminación normales, tanto en animales sanos como con tumores, fueron los esperados según la bibliografía, ya sea en NSQ como en hígado; sin embargo este patrón de expresión se perdió en los animales bajo JL. *Cyp1a1* presentó menor expresión en tejido hepático de animales con tumor bajo LD, respecto de los animales sanos en igual condición de luz. Este mismo gen mostró un patrón de expresión diferencial en tejido hepático de animales con tumor bajo JL. *Per1* y *Per2* mostraron marcadas reducciones en sus niveles de expresión diurna al evaluar el tejido tumoral bajo JL, respecto del mismo tejido en animales bajo LD. Podría inferirse que: 1) el solo desarrollo de un tumor no es capaz de afectar el reloj central y hepático, al menos bajo las condiciones evaluadas; 2) niveles disminuidos de *Per* en el tumor se relacionan a su posible rol supresor de tumores, y 3) el tumor extra-hepático en condiciones desincronizadas podría modificar la expresión de GMX en el hígado, a través de la desincronización del sistema inmune, favoreciendo el desarrollo tumoral.

El diseño caso-control incluyó 125 casos (pacientes con leucemia, linfoma y mieloma) y 310 controles, concurrentes al Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. Rossi (La Plata, Buenos Aires). Se tomaron muestras de sangre y se les realizó una encuesta a los participantes, previo consentimiento informado. A partir del cuestionario, se obtuvieron datos socio-demográficos e información sobre hábitos de vida (tabaquismo, consumo de alcohol y café, ingesta de carnes asadas y alimentos enlatados), funcionalidad del paciente (cambios en el peso, en el apetito y en el humor, cansancio físico o mental,

cansancio al despertar, y calidad del sueño, entre otros) e historia de la enfermedad. Se evaluaron el polimorfismo de longitud del gen reloj *PER3* (4 o 5 repeticiones de 54 pb) mediante PCR, las deleciones de los GMX *GSTT1* y *GSTM1* mediante PCR multiplex, y los alelos T/C de *CYP1A1\*2A* (polimorfismo *MspI*) mediante PCR-RFLP, con posterior visualización en geles de agarosa. Los análisis estadísticos se realizaron con STATA 11.1. Los genotipos de *PER3* 4/5 + 5/5 se asociaron a un aumento en el riesgo de leucemia (OR=1.99, p=0.032). Además, los pacientes oncológicos con estos genotipos expresaron roncar más y sentir mayor fatiga al despertar. La variable “cambios en el humor” también se asoció significativamente al cáncer hematológico. Las variantes en los GMX no mostraron asociación alguna con las EOH evaluadas. El consumo de carnes asadas 3 o más veces/mes y el consumo diario de café se asociaron significativamente a un aumento en el riesgo de enfermedad (OR=1.72, p=0.02 y OR=1.77, p=0.03, respectivamente). El polimorfismo de *PER3* podría tener un rol en el riesgo de leucemia, y podría ser un marcador de las diferencias individuales en el sueño y la vulnerabilidad a su interrupción. Respecto a los hábitos dietarios de consumo de carnes asadas y café, nuestro estudio proporciona datos novedosos relacionados a la etiología de las EOH para nuestra población.

---

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ANOVA: análisis de la varianza

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CCG: *clock-controlled genes*, genes controlados por el reloj

CT: *circadian time*

CYP450: citocromo P450

D-MEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DD: *dark-dark*

DS: desviación estándar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EMX: enzimas metabolizantes de xenobióticos

EOH: enfermedades onco-hematológicas

GMX: genes metabolizantes de xenobióticos

GST: glutatión S-transferasa

HAT: histona-acetiltransferasa

HPA: hidrocarburos policíclicos aromáticos

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

Ig: inmunoglobulinas

JL/JLC: *jet lag* crónico

LD: *light-dark*

LH: linfoma de Hodgkin

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LLC: leucemia linfoblástica crónica

LMA: leucemia mieloblástica aguda

LMC: leucemia mieloblástica crónica

LNH: linfoma no-Hodgkin

MM: mieloma múltiple

NSQ: núcleos supraquiasmáticos

OR (IC 95%): *odds ratio* (intervalo de confianza 95%)

PARbZip: *proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper*

PCR: *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

PCR-RFLP: *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*

qPCR: *quantitative PCR*, PCR cuantitativa, en tiempo real o *real time PCR*

Ref: referencia

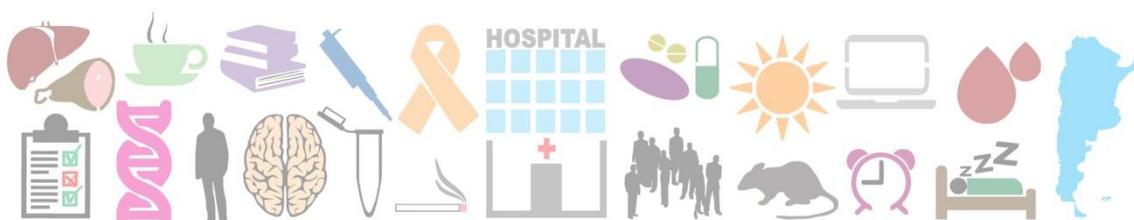
SNA: sistema nervioso autónomo

SNP: *single nucleotide polymorphism*, polimorfismo de nucleótido único

UNQ: Universidad Nacional de Quilmes

ZT: *zeitgebers*

# INTRODUCCIÓN



## **CÁNCER**

### **Generalidades del desarrollo tumoral**

Según la Organización Mundial de la Salud, “cáncer” es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; “tumores malignos” o “neoplasias malignas” son sinónimos de cáncer<sup>[1]</sup>. Bajo estos términos están comprendidas más de 100 enfermedades distintas, con diversos factores de riesgo y epidemiología. Una de las características principales del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis<sup>[2]</sup>. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer.

Los tumores son tejidos complejos formados por múltiples tipos celulares que interactúan entre sí. El estroma asociado al tumor es un participante activo en la tumorigénesis y no un espectador pasivo, y por ello las células del estroma contribuyen al desarrollo y la expresión de ciertas facultades distintivas de los tumores. En forma breve, podemos reconocer 10 capacidades o características que describen a las células y los tejidos tumorales<sup>[3]</sup>:

- 1) inmortalidad replicativa
- 2) evasión de la respuesta inmune
- 3) evasión de la acción de supresores del crecimiento
- 4) mantenimiento de la señalización proliferativa
- 5) desregulación del metabolismo energético celular
- 6) resistencia a la muerte celular
- 7) mutación e inestabilidad genómica
- 8) inducción de la angiogénesis
- 9) activación de la invasión y la metástasis
- 10) promoción de la inflamación

### **Aspectos genéticos del cáncer**

A pesar de la diversidad, todos los cánceres comparten una patogénesis común. De manera similar a como ocurre en la evolución darwiniana, el

desarrollo tumoral se basa en dos procesos: 1) la adquisición continua de variación genética en las células individuales a través de mutaciones al azar, y 2) la selección natural actuando sobre la diversidad fenotípica resultante<sup>[2]</sup>. Cabe destacar que el genoma tumoral es diferente del genoma del cigoto que le dio origen al organismo, y por ello las mutaciones acumuladas en las células tumorales se denominan “somáticas”, a fin de distinguirlas de las mutaciones presentes en la línea germinal que se transmiten a la descendencia.

Las mutaciones somáticas presentes en el genoma tumoral pueden ser sustituciones de una base por otra, inserciones o deleciones de fragmentos de ADN cortos o largos, rearrreglos de segmentos del ADN o variaciones en el número de copias de los genes (amplificaciones o reducciones). Además, las células tumorales pueden adquirir secuencias de ADN completamente nuevas, provenientes de fuentes exógenas como los virus. El genoma tumoral también adquiere cambios epigenéticos que alteran la estructura de la cromatina y la expresión génica.

Si bien el cáncer es producto de las alteraciones recién mencionadas, no todas las mutaciones somáticas presentes en el genoma están involucradas en el desarrollo de la enfermedad. Para diferenciarlas, se crearon los términos “*passenger mutation*” y “*driver mutation*”. Una mutación *driver* es aquella implicada en la oncogénesis: confiere ventajas en el crecimiento de las células tumorales y ha sido seleccionada positivamente en el microambiente tisular donde el cáncer aparece. Una mutación *passenger* no ha sido seleccionada, no confiere ventaja alguna y por lo tanto no ha contribuido al desarrollo del cáncer; sin embargo se encuentran allí porque durante las divisiones celulares suelen ocurrir mutaciones sin consecuencias funcionales<sup>[2,4]</sup>. Las mutaciones *passenger* serán transmitidas a lo largo de la expansión clonal y estarán presentes en todas las células que forman el tumor. Una importante sub-clase de mutaciones *driver* es aquella que confiere resistencia a la terapia. Se encuentran típicamente en cánceres recurrentes que inicialmente respondieron al tratamiento, pero luego manifiestan resistencia. Algunas mutaciones de resistencia existen como *passengers* desde antes de iniciado el tratamiento, formando parte de sub-clones minoritarios dentro de la población celular tumoral. Cuando el ambiente selectivo cambia por el inicio de la terapia, las

mutaciones *passengers* se convierten a *drivers*, y el sub-clon resistente se expande de forma preferencial<sup>[5,6]</sup>.

### **Inestabilidad genómica**

La gran mayoría de los cánceres humanos presentan tasas de mutación sumamente elevadas: se dice que las células son genéticamente inestables. Esta inestabilidad puede asumir distintas formas; algunas células tumorales presentan deficiencias en el sistema de reparación local del ADN dañado o en el sistema de corrección de los errores de replicación. Otras células tumorales tienen problemas en mantener la integridad de sus cromosomas, lo cual comporta anomalías en su cariotipo. Frecuentemente, las mutaciones desestabilizadoras no son hereditarias sino que aparecen *de novo*, antes y mientras el tumor se desarrolla. Aunque las mutaciones en los genes reguladores del crecimiento, tales como los genes supresores de tumores y los oncogenes, se encuentran comúnmente asociados al cáncer y son considerados la causa general de esta enfermedad, mutaciones en otra gran cantidad de genes tienen relación con la inestabilidad genómica observada en procesos cancerosos<sup>[7]</sup>.

### **El rol de los polimorfismos**

Las variaciones genéticas comunes son consideradas importantes determinantes de la susceptibilidad a la enfermedad. Actualmente, los SNPs (*single nucleotide polymorphism*, polimorfismos de nucleótido único) son las variaciones genéticas más estudiadas. A pesar de haberse encontrado poca evidencia que soporte una asociación fuerte entre los SNPs y el riesgo de cáncer, se cree que, aun con un efecto pequeño, éstos podrían suponer un riesgo significativo a nivel poblacional<sup>[8]</sup>. Es importante también, evaluar el impacto de los SNPs en el desarrollo del cáncer, bajo el contexto de las interacciones gen-gen y gen-ambiente.

En la actualidad, se considera que los polimorfismos metabólicos (diferencias en la forma en que las personas metabolizan los carcinógenos químicos), pueden explicar las diferencias en la sensibilidad de los individuos al cáncer<sup>[9]</sup>. Aunque los polimorfismos se presentan en genes de baja penetrancia, parece probable que en conjunto, expliquen gran parte de la

sensibilidad innata al cáncer y que por consiguiente, sea sustantiva su contribución potencial a la aparición de neoplasias malignas.

### **La genética como herramienta**

Los avances logrados en el área de la genética la convirtieron en una disciplina con importantes aportes para el control del cáncer. Básicamente, la genética constituye una herramienta para: 1) la identificación de los individuos en riesgo de un cáncer específico, que conduzca a estrategias preventivas o de tamizaje para un individuo o miembros de una familia, y 2) la identificación del subtipo de cáncer, de modo que se pueda adaptar el tratamiento con el fin de combatir esa enfermedad específica.

Sin embargo, no se debe exagerar la función potencial de la genética. Numerosos estudios revelaron que los determinantes primarios de la mayoría de los cánceres son factores del modo de vida, como los hábitos de consumo de tabaco, alimentarios y la falta de ejercicio, además de agentes infecciosos, más que factores genéticos hereditarios<sup>[9]</sup>. La identificación de los individuos con alto riesgo de sufrir la enfermedad permite tomar decisiones fundamentadas con respecto a la reproducción, el modo de vida y las estrategias de reducción del riesgo clínico. Cuando la información genética indica un mayor riesgo de cáncer, las personas afectadas pueden ser sometidas a intervenciones de detección temprana más intensivas o más frecuentes de lo habitual, en un intento de detectar el cáncer en un estadio inicial<sup>[9]</sup>.

Resultan de especial importancia los estudios dirigidos a la identificación de marcadores moleculares de cáncer de mama/ovario hereditarios, y cáncer colorrectal/poliposis colónicas hereditarias. En nuestro país, según el reporte de 2015 de la Red Argentina de Cáncer Familiar, el 84% de las casi 1300 consultas realizadas dentro de esta Red, correspondieron a los tipos de cáncer hereditarios arriba mencionados. Durante ese año, se realizaron aproximadamente 1100 pedidos de estudios moleculares por sospecha clínica de síndromes hereditarios, donde el 66% de dichos estudios involucraron a los genes *BRCA1* y *BRCA2*, genes asociados al síndrome de Lynch y poliposis colónica familiar. Actualmente, resulta indispensable la evaluación del riesgo genético en oncología, donde confluyen distintas áreas clínicas y técnico-

biológicas de variada complejidad, siendo este abordaje integral, un desafío para el sistema de salud<sup>[10]</sup>.

### **Diagnóstico y tratamiento del cáncer**

El primer paso para el tratamiento del cáncer es un diagnóstico certero. Requiere combinar una cuidadosa evaluación clínica con métodos de diagnóstico de varias disciplinas (citología, histopatología, imaginología, laboratorio bioquímico y molecular, etc.). Una vez que se confirma un diagnóstico, es necesario evaluar la etapa de la enfermedad, con el propósito de elegir una terapia y generar un pronóstico. El objetivo principal del tratamiento radica en curar el cáncer o prolongar la vida de forma considerable, pudiendo incluir cirugía, radioterapia, quimioterapia, uso de fármacos contra dianas específicas, o alguna combinación de estos procedimientos. Otro objetivo importante consiste en mejorar la calidad de vida del paciente, lo cual se puede lograr con atención paliativa y apoyo psicológico. Tanto los pacientes como sus familias, afrontan los problemas asociados a una enfermedad en potencia letal, por lo que es fundamental mejorar la calidad de vida del paciente mediante la prevención y el alivio del sufrimiento, la detección temprana, evaluación y tratamiento del dolor, y otros problemas físicos, psicosociales y espirituales<sup>[9]</sup>.

### **Factores de riesgo**

Más del 30% de las defunciones por cáncer podrían evitarse modificando o evitando los principales factores de riesgo para el cáncer: el consumo de tabaco, el exceso de peso o la obesidad, las dietas malsanas con un consumo insuficiente de frutas y hortalizas, la inactividad física, el consumo de bebidas alcohólicas, las infecciones por virus del papiloma humano o virus de la hepatitis B (entre otros), radiaciones ionizantes y no ionizantes, la contaminación del aire de las ciudades y el humo generado en la vivienda por la quema de combustibles sólidos<sup>[1]</sup>.

Según el informe “Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos 2012-2014”<sup>[11]</sup> de la *American Cancer Society*, los cánceres de estómago, hígado y cuello uterino, relacionados todos ellos con agentes infecciosos, son más comunes en países en vías de desarrollo económico,

especialmente los de América Central y América del Sur. Los factores económicos, sociales y culturales influyen en la incidencia y supervivencia del cáncer. De esta manera, los ingresos y el nivel educativo de la persona son factores relevantes que afectan la salud y la longevidad, influyen en el predominio de los factores de riesgo subyacentes del cáncer, e inciden directamente en la posibilidad de acceder al seguro médico, a la atención preventiva, a la detección temprana y al tratamiento. Factores culturales como el idioma, creencias, valores y tradiciones también pueden influir en las conductas frente a la enfermedad y en los enfoques de la atención médica.

En conjunto, los factores de riesgo relacionados a los hábitos de vida, los factores económicos, sociales y culturales, los provenientes del medio ambiente, los genéticos, el estado de salud pasado y presente, y los factores psicológicos, influyen considerablemente en la carga que el cáncer impone en la población latina.

### **Aspectos relativos a la psico-oncología del cáncer**

(conceptos extraídos de <sup>[12-14]</sup>)

En lo que respecta al bienestar emocional del paciente oncológico, hay que considerar una serie de variables socio-demográficas y médicas que influyen en la respuesta adaptativa al cáncer. La edad, el género, el nivel educativo, el estado marital, el tiempo transcurrido desde el diagnóstico, la localización del tumor y el tipo de tratamiento son algunos de los factores que intervendrán en la calidad de vida del paciente.

Ante el diagnóstico de cáncer, la enfermedad por sí misma puede ser considerada por un individuo como un agente de estrés altamente amenazante. El diagnóstico de una enfermedad severa induce en la mayoría de los casos una respuesta de estrés extremadamente alta. El *distress* (estrés patológico, experiencia emocional desagradable de naturaleza psicológica, social y espiritual) se observa frecuentemente antes, durante y después del tratamiento aplicado frente a las enfermedades oncológicas -en general-, y onco-hematológicas (EOH) -en particular-; se presenta en un espectro continuo de severidad, que alcanza niveles mayores a los observados en la población general. Los desórdenes de ansiedad, humor y adaptación son particularmente comunes; además, los pacientes experimentan trastornos en los ámbitos

social, familiar y laboral, siendo separados durante la quimioterapia, el trasplante y la internación, de aquellas personas que los apoyan y contienen.

Los pacientes son más vulnerables al *distress* en los momentos en los que cambia el curso del pronóstico o el tratamiento, cuando aparecen efectos adversos severos, cuando deben re-internarse o cuando hay cambios en el seguimiento médico. Los períodos en los que hay compromiso inmunológico limitan radicalmente el contacto social. También existen la posibilidad de perder el trabajo y la estigmatización asociada a la enfermedad. Aquellos pacientes que experimentan problemas psiquiátricos, como ansiedad o depresión, están en riesgo de tener respuestas pobres al tratamiento, estadías más largas en el hospital y mayor mortalidad.

La depresión durante el tratamiento frente al cáncer está asociada a respuestas adversas, menor calidad de vida, aumento en síntomas tales como el dolor, y menor adherencia al cuidado médico. En pacientes con cáncer hematológico, la ansiedad se presenta en el 10-30% de los casos; estos niveles disminuyen con el tiempo a medida que el paciente se adapta en el curso del tratamiento.

El insomnio moderado a severo es muy frecuente, y generalmente acompaña a la fatiga y a cambios en el funcionamiento de los intestinos. El insomnio puede ser causado o exacerbado por la ansiedad, la depresión, el dolor, el delirio o las medicaciones como los corticosteroides y los diuréticos. El funcionamiento del paciente durante el día puede verse significativamente perjudicado por el insomnio, así como también se agudizan la fatiga, la depresión, el deterioro cognitivo y la propensión a tener accidentes.

Respecto a la sexualidad y la fertilidad, los pacientes son sometidos a regímenes que afectan su imagen corporal, su función sexual y sus status reproductivo y hormonal.

Las EOH están asociadas a *distress* psicosocial en muchos pacientes. Sus familiares y sus auxiliares o cuidadores también están en riesgo de sufrir estos trastornos. Las futuras investigaciones en este campo deberán focalizarse en la identificación de predictores -incluyendo los genéticos y otros biomarcadores-, en la etiología de estas condiciones y en el manejo personalizado de los casos neuropsiquiátricos.

## Cáncer hematológico

Las hemopatías malignas son un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan el normal funcionamiento de las células sanguíneas. De acuerdo al Atlas de Mortalidad por Cáncer publicado por el Ministerio de Salud de Argentina<sup>[15]</sup>, las EOH fueron la causa de más de 18500 muertes de 2007 a 2011. Estos desórdenes muestran una incidencia de aproximadamente 850000 casos/año a nivel mundial, según lo reportado por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) en su último reporte GLOBOCAN 2012<sup>[16]</sup>. Para una mejor descripción de las enfermedades estudiadas en esta tesis, las clasificaremos en los siguientes grupos<sup>b</sup>:

### Neoplasias mieloproliferativas crónicas

Bajo esta denominación, se agrupan la leucemia mieloide crónica (LMC), la policitemia vera, la trombocitemia esencial y la mielofibrosis primaria. Se caracterizan por la alteración clonal de la célula *stem*, manifestando neoplasia que afecta la serie mieloide y con curso inicialmente crónico. Para este trabajo, resulta de mayor interés la LMC, donde la serie granulocítica es la predominantemente afectada, y el trastorno ocurre en la proliferación y no en la maduración de las células. En esta patología tiene especial importancia la presencia del cromosoma Filadelfia, con la traslocación t(9;22) y su producto de fusión, el gen *BCR-ABL*, el cual es blanco terapéutico de los inhibidores de tirosina cinasa que revolucionaron el tratamiento de esta enfermedad. La edad de presentación suele ser entre los 30 y los 60 años, donde la mayoría de los casos se diagnostican en la fase asintomática. La LMC puede transformarse en leucemia aguda, tanto mieloblástica (la mayoría de las veces) como linfoblástica.

### Leucemias agudas

Se caracterizan por la proliferación incontrolada de células muy inmaduras -blastos- que infiltran la médula ósea, desplazando la hematopoyesis normal. Hay trastornos de proliferación y de maduración de las células. Como consecuencia, se presentan síndromes anémico, infeccioso y

---

<sup>b</sup> Las descripciones de las patologías fueron elaboradas según la referencia <sup>[197]</sup>.

hemorrágico. Las leucemias agudas se dividen en mieloblásticas y linfoblásticas (LMA y LLA, respectivamente), y para su diagnóstico se requieren técnicas morfológicas, citoquímicas, inmunológicas, citogenéticas y moleculares; los últimos dos tipos de estudios tienen importantes implicaciones patogénicas y pronósticas. En general, se considera leucemia aguda cuando en la médula ósea existe un porcentaje de blastos mayor al 20% de la celularidad medular. Las LMA suelen aparecer a partir de los 50 años, mientras que las LLA son más frecuentes en niños.

### Síndromes linfoproliferativos

En la práctica, se denomina de esta forma a un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides, caracterizadas por un cúmulo de linfocitos B o T de apariencia morfológica madura y función anormal, que al momento del diagnóstico se encuentran leucemizados infiltrando la médula ósea y afectando otros tejidos linfoides. La mayoría de los síndromes linfoproliferativos crónicos son de línea B, y se dan en personas >50 años de edad, siendo el ejemplo más característico y frecuente la leucemia linfática crónica (LLC). Ésta se caracteriza por la acumulación y proliferación de linfocitos inmunoincompetentes de pequeño tamaño, aspecto maduro y fenotipo linfoide B característico. En la LLC no existe un marcador citogenético y/o molecular específico. Alrededor del 50% de los casos tienen mutaciones somáticas en los genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, y en el 80% de los pacientes se detectan alteraciones citogenéticas varias. Al diagnóstico, la mayoría de los pacientes no requieren tratamiento.

### Linfoma no-Hodgkin

Es una enfermedad clonal de células B, T o NK (*Natural Killer*) en varios estadios de diferenciación. Estas células proliferan en los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides, e infiltran la médula ósea y otros tejidos. Las variantes más importantes son el linfoma folicular, difuso de células B grandes, del manto, marginales y Burkitt. Entre los factores que se han relacionado con el desarrollo de determinados subtipos de LNH podemos mencionar: agentes infecciosos (como virus y bacterias), alteraciones inmunitarias y exposición a agentes tóxicos (radiaciones ionizantes, herbicidas, pesticidas, etc.).

## Linfoma de Hodgkin

Es una neoplasia ganglionar donde la célula proliferante característica es la célula de Reed-Sternberg, de origen linfoide B. Tiene un pico de incidencia entre los 15-30 años de edad, y otro más adelante, a partir de los 50 años. En los infiltrados del linfoma de Hodgkin se pueden encontrar células neoplásicas (células de Reed-Sternberg y sus variantes) y células reactivas presentes en la zona (linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos e histiocitos).

## Gammapatías monoclonales

Se incluyen las proliferaciones clonales de las células B en los últimos estadios madurativos (linfoplasmocitos y células plasmáticas). Se evidencia presencia en suero y/u orina de una inmunoglobulina (Ig) monoclonal. El mieloma múltiple (MM) es una gammapatía monoclonal maligna, que aparece en personas mayores de 50 años. En el MM, la célula plasmática sufre una serie de eventos oncogénicos (traslocaciones en los genes de Ig, inestabilidades cariotípicas, mutaciones somáticas) que conducen a su transformación en célula tumoral. Además, en esta patología es clave la interacción entre las células plasmáticas y el estroma medular al que se adhieren.

## ENZIMAS METABOLIZANTES DE XENOBIÓTICOS

### Generalidades del sistema de metabolización de xenobióticos<sup>c</sup>

La habilidad de las personas para metabolizar las drogas es un proceso natural, que involucra las mismas vías enzimáticas y sistemas de transporte usados para el normal metabolismo de los constituyentes de la dieta. Un amplio número de diversas enzimas ha evolucionado en los animales, con la función de metabolizar compuestos extraños -xenobióticos-. Hoy en día, la mayoría de los xenobióticos a los que los humanos estamos expuestos, provienen de fuentes como la contaminación ambiental, aditivos en las comidas, productos cosméticos, agroquímicos, alimentos procesados y drogas. Con muy pocas excepciones, todos los xenobióticos son objeto de uno o múltiples pasos, que constituyen los sistemas enzimáticos de fase I, II o III (descriptos más adelante). Como un paradigma general, el metabolismo sirve para convertir estos químicos hidrofóbicos en derivados hidrofílicos, que pueden ser fácilmente eliminados a través de la orina o la bilis. Este proceso se denomina biotransformación.

Las enzimas metabolizantes de xenobióticos (EMX), codificadas por la familia de genes metabolizantes de xenobióticos (GMX), convierten las drogas y demás compuestos exógenos en derivados hidrofílicos, que pueden eliminarse con mayor facilidad por excreción hacia los compartimientos acuosos de los tejidos. El sistema de EMX también metaboliza compuestos endógenos propios, y son además, las responsables de la finalización de la actividad biológica de las drogas.

Mientras que las EMX son responsables de facilitar la eliminación de químicos del cuerpo, paradójicamente, la mismas enzimas también pueden convertir ciertos compuestos en metabolitos carcinogénicos, altamente tóxicos y reactivos. Dependiendo de la estructura del sustrato químico, las EMX producen metabolitos electrofílicos que pueden reaccionar con macromoléculas celulares nucleofílicas como el ADN, ARN y las proteínas, pudiendo causar muerte celular y toxicidad al órgano.

---

<sup>c</sup> Conceptos extraídos de la referencia <sup>[27]</sup>.

## Enzimas Metabolizantes de Xenobióticos

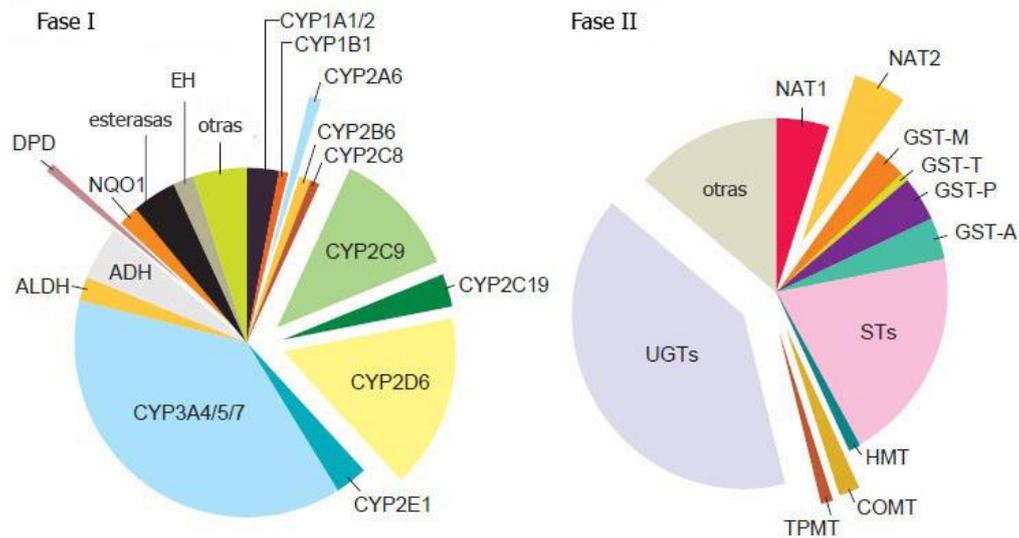
Las EMX han sido agrupadas en reacciones de fase I, II y III, según su función. Pueden actuar como “detoxicantes” (reduciendo la reactividad de los compuestos genotóxicos y favoreciendo su excreción), o “activadoras” (metabolizando los sustratos hacia especies más reactivas). Algunas enzimas tienen ambos roles, tanto de activación como de detoxificación, dependiendo del sustrato<sup>[17]</sup>.

Las reacciones de la fase I (“funcionalización”) consisten en realizar modificaciones estructurales relativamente menores sobre la sustancia original mediante oxidación, reducción o hidrólisis, para obtener un metabolito más hidrosoluble<sup>[18]</sup>; en esta fase se introducen grupos funcionales -OH, -COOH, -SH, -O-, o NH<sub>2</sub>, que alteran dramáticamente las propiedades biológicas del compuesto. Es frecuente que las reacciones de la fase I den lugar a que el compuesto se vuelva a modificar después, en las reacciones de la fase II. Las reacciones de esta primera fase están mediadas, básicamente, por una superfamilia de enzimas de gran versatilidad, conocidas con el término colectivo de citocromo P450 (CYP450), aunque también pueden intervenir otras superfamilias, como las flavín monooxigenasas y epóxido hidrolasas.

Las reacciones de la fase II producen el acoplamiento de una molécula endógena hidrosoluble a la sustancia química -original o metabolito de fase I-, buscando así facilitar la excreción. Las reacciones de la fase II suelen calificarse de “conjugación” o “derivación”<sup>[18]</sup>. En esta fase están involucradas muchas superfamilias de enzimas conjugantes; entre las más importantes están las glutatión-S-transferasas (GSTs), UDP-glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas, N-acetiltransferasas y metiltransferasas. En la figura 1 se muestran las contribuciones aproximadas de las EMX de fase I y II al metabolismo de xenobióticos.

Las enzimas de fase III son transportadores que facilitan la eliminación de los compuestos metabolizados previamente, y funcionan además como barreras que limitan la penetración de los xenobióticos en el organismo. Enzimas de fase III son, por ejemplo, la glicoproteína P y las proteínas de resistencia múltiple a drogas<sup>[19]</sup>.

El hígado es considerado el mayor sitio de *clearing* metabólico, tanto para los químicos endógenos (colesterol, hormonas esteroideas, ácidos grasos,



**Figura 1: Contribuciones de cada EMX al metabolismo de fase I y II.** ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; CYP, citocromo P450; EH, epóxido hidrolasas; DPD, dihidropirimidina deshidrogenasa; NQO1, NADPH:quinona oxidoreductasa; COMT, catecol O-metiltransferasa; GST, glutatión S-transferasa; HMT, histamina metiltransferasa; NAT, N-acetiltransferasa; STs, sulfotransferasas; TPMT, tiopurina metiltransferasa; UGTs, uridina 5'-trifosfato glucuronosiltransferasas. (Modificado de [23])

proteínas) como para los exógenos. Sin embargo, algunas enzimas metabolizantes se encuentran con niveles bastante altos en el tracto gastrointestinal, las gónadas, el pulmón, el cerebro y el riñón, y están presentes de cierto modo en todas las células vivas<sup>[18]</sup>. A nivel celular, se localizan en la fracción citoplasmática, en el retículo endoplasmático, y en las mitocondrias<sup>[20]</sup>, así como en el núcleo<sup>[17]</sup> aunque en menor proporción.

### Polimorfismos de GMX. Correlación genotipo-capacidad metabólica

Hace décadas que se conocen las diferencias genéticas en el metabolismo de diversos fármacos y sustancias químicas ambientales<sup>[21,22]</sup>. Esas diferencias suelen denominarse polimorfismos farmacogenéticos, los cuales consisten en variantes alélicas que se dan con una frecuencia relativamente alta en la población, y están generalmente asociadas a aberraciones en la expresión o función enzimática. Todos los polimorfismos farmacogenéticos estudiados hasta el momento difieren en sus frecuencias entre las diferentes etnias<sup>[23]</sup>.

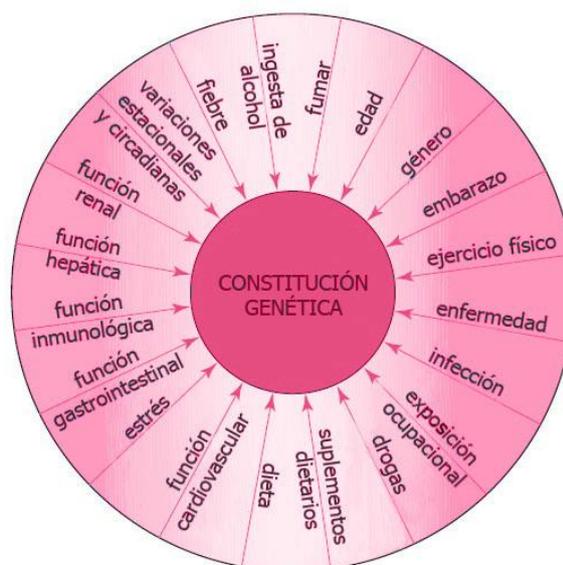
Desde un punto de vista general, en cuanto a la capacidad metabólica (fenotipo) para las diferentes clases de compuestos químicos, los individuos pueden ser clasificados según la variante genotípica que posean, y la tasa

metabólica que ésta determine, en: a) metabolizadores rápidos, b) metabolizadores intermedios, y c) metabolizadores lentos. La determinación de estos fenotipos de metabolización para un individuo, en cada una de las vías metabólicas, y para cada una de las EMX, se efectúa mediante el empleo de fármacos que son biotransformados a través de la vía y/o enzima en estudio. Estos fármacos se denominan “fármaco sonda” o “compuesto testigo”; mediante la administración oral del mismo, con la posterior determinación de la razón metabólica (medición del metabolito derivado del compuesto inicial, ya sea a nivel plasmático o en la orina del individuo), se logra establecer la velocidad de metabolización que posee el individuo, determinando consecuentemente su fenotipo. El desarrollo, durante las últimas décadas, de un gran número de técnicas para la detección de una amplia variedad de polimorfismos, permite identificar el genotipo, mediante el estudio de la secuencia genómica, para cada una de las EMX. A través de la constante correlación entre velocidad de metabolización del compuesto testigo y un genotipo determinado, estudiados de modo paralelo en un mismo individuo, actualmente es posible categorizar y definir la capacidad metabólica, mediante el estudio a nivel genómico de los polimorfismos que presenta el individuo para la EMX, sin necesidad de efectuar los test químicos de metabolización.

Los mecanismos moleculares de inactivación o modificación funcional de las EMX incluyen mutaciones en el sitio de empalme -resultando en la falta de un exón-, repetición de microsatélites, duplicación génica, mutaciones puntuales que resultan en codones de terminación, sustituciones aminoacídicas que alteran la estabilidad o la actividad catalítica, o deleciones completas del gen<sup>[23]</sup>. Para los GMX, los SNPs y otros polimorfismos se presentan en frecuencias mayores a 1 cada 1000 pares de bases; es posible que estas variantes se presenten en forma usual debido a la redundancia entre las enzimas del sistema.

Los polimorfismos farmacogenéticos se asociaron a un aumento en el riesgo de algunos tipos de cánceres, debido al deterioro de la capacidad para inactivar moléculas mutágenas endógenas o exógenas. Algunos ejemplos se verán en las secciones referentes a GSTs y CYPs.

En resumen, es la compleja interacción de las diversas superfamilias de EMX en el individuo, lo que en última instancia determinará su respuesta particular a una determinada sustancia química<sup>[20,22,24-26]</sup>. Esta variabilidad genética en las EMX puede tener efectos considerables sobre muchos procesos bioquímicos críticos que se desarrollan en la célula, provocando con ello importantes diferencias en la respuesta tóxica<sup>[18]</sup>. De todas



**Figura 2:** Factores endógenos y exógenos que, en interacción con la constitución genética, contribuyen a la variación en la respuesta a xenobióticos. (Modificado de <sup>[198]</sup>)

formas, no debe olvidarse que la respuesta a los xenobióticos es un fenotipo producto de los genes y el ambiente: la variación en la respuesta puede ser explicada por variaciones en factores ambientales y genéticos, en forma individual o combinados (Fig. 2)<sup>[27]</sup>.

A continuación se detallan las características principales de las familias de enzimas estudiadas en esta tesis, CYPs y GSTs. Una revisión de las propiedades relevantes del resto de las enzimas presentadas en la figura 1 puede encontrarse en los trabajos <sup>[18,23,27-30]</sup> de la bibliografía citada, los cuales han sido la base de los conceptos presentados a continuación.

### Citocromo P450

La superfamilia de enzimas CYP450 participan en la fase I del metabolismo de compuestos endógenos y exógenos, oxidándolos hacia sustancias más hidrofílicas. Tres familias -CYP1, CYP2 y CYP3- contribuyen de manera mayoritaria al metabolismo oxidativo de más del 90% de drogas de uso clínico, mientras que otras familias participan en el metabolismo *housekeeping* de moléculas endógenas<sup>[30]</sup>.

Además de su expresión en tejido hepático, las enzimas CYPs están presentes de manera apreciable en tejidos extra-hepáticos como la mucosa

intestinal, pulmón, riñón, cerebro, placenta, mucosa olfatoria y piel, siendo la mucosa intestinal el sitio más importante de biotransformación de drogas<sup>[31,32]</sup>.

La actividad enzimática de CYPs varía entre los individuos de cada población. Este hecho tiene profundas influencias en la respuesta *in vivo* a las drogas<sup>[33]</sup>. Las enzimas CYPs pueden ser inducidas e inhibidas, por lo que las mutaciones genéticas tienen un rol dominante en la variación de la actividad enzimática.

### **Polimorfismos**

Los polimorfismos genéticos en las enzimas CYPs afectan principalmente el metabolismo de los compuestos que son sustratos de cada enzima en particular, originando diferencias en la respuesta a drogas y en el riesgo de reacciones adversas<sup>[34,35]</sup>. Los SNPs constituyen las mutaciones más comunes que se encuentran en los genes *CYPs*; fenotípicamente, se pueden distinguir metabolizadores ultrarrápidos, extensivos, intermedios y pobres.

CYP1A1 es una aril hidrocarburo hidroxilasa, expresada principalmente en tejidos extra-hepáticos. En humanos, CYP1A1 comparte el 80% de la secuencia aminoacídica con CYP1A2, y el 40% con CYP1B1, por lo que sus especificidades de sustrato se superponen. Se observó una amplia variabilidad inter-individual en la eliminación de drogas metabolizadas principalmente por CYP1A1/2<sup>[30]</sup>. Además, estas variantes junto a CYP1B1 juegan un papel importante en la bioactivación de una variedad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), aminas/amidas heterocíclicas aromáticas y micotoxinas, catalizando la formación de intermediarios mutagénicos<sup>[36]</sup>.

Se ha sugerido que varios SNPs en *CYP1A1* influyen su inducción. El primer polimorfismo descrito consiste en una transición T → C en la posición 3801 del ADN, creando un sitio de restricción para la enzima *MspI*<sup>[37]</sup>. Esta sustitución se encuentra en la región 3' no codificante, y la variante que define (*CYP1A1\*2A*, *MspI* o m1) se asoció a un fenotipo altamente inducible, lo que provocaría actividad enzimática aumentada con la consiguiente modificación en la susceptibilidad al cáncer<sup>[38]</sup>.

## Glutación S-transferasas

Las enzimas GSTs catalizan la transferencia de glutación a reactivos electrofílicos, protegiendo a las macromoléculas celulares de la interacción con electrófilos con -O, -N o -S, y a su vez evitando el daño en el ambiente celular<sup>[27]</sup>. El co-sustrato en la reacción es el tripéptido glutación, sintetizado a partir de ácido  $\gamma$ -glutámico, cisteína y glicina. El glutación existe en la célula en su forma reducida (GSH) u oxidada (GSSG), siendo la razón GSH:GSSG crítica para el mantenimiento del ambiente celular en un estado reducido. Las GSTs juegan, de esta manera, un rol importante en la detoxificación de drogas, toxinas, carcinógenos y especies reactivas de oxígeno<sup>[39]</sup>.

Se identificaron más de 20 GSTs humanas, las cuales se dividen en tres subfamilias: las formas citosólicas, las microsomales y las mitocondriales. Las primeras resultan más importantes para el metabolismo de drogas y xenobióticos, mientras que las segundas lo son para el metabolismo endógeno de leucotrienos y prostaglandinas. En los mamíferos, las GSTs citosólicas se dividen en siete clases, denominadas alfa (GSTA1-2), mu (GSTM1-5), omega (GSTO1), pi (GSTP1), sigma (GSTS1), dseta -theta- (GSTT1-2) y zeta (GSTZ1); presentan, entre ellas, un solapamiento en la especificidad de sustratos<sup>[27,39]</sup>. GST kappa es la única enzima mitocondrial hasta el momento también presente en los peroxisomas.

Por otra parte, las GSTs presentan funciones no catalíticas, involucradas en muchos procesos celulares importantes, tales como la respuesta al estrés, la proliferación celular, la apoptosis, la oncogénesis, la progresión tumoral y la resistencia a las drogas<sup>[28]</sup>. Las funciones no enzimáticas de las GSTs involucran su interacción con proteínas celulares tales como JNK (jun N-terminal kinase), MAPK8 (mitogen-activated protein kinase 8), TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor), ASK (apoptosis-signal-regulating kinase), PKA/PKC (serine/threonine kinases) y TGM2 (tissue transglutaminase 2), durante la cual, o la proteína interactuante sufre alteraciones funcionales, o la proteína GST es modificada postraduccionalmente y/o su función es alterada.

## Polimorfismos

Al igual que muchas otras enzimas involucradas en el metabolismo de drogas y xenobióticos, todas las GST son polimórficas. Los genotipos *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* expresan un fenotipo nulo debido a la delección del gen; así, los individuos que son polimórficos en estos loci están predispuestos a sufrir toxicidad por agentes que son sustratos de estas GSTs. Por ejemplo, el alelo *GSTM1\*0* se observa en el 50% de la población caucásica y fue asociado a neoplasias malignas en pulmón, colon y vejiga. Sin embargo, el efecto de los polimorfismos de *GSTM* en la susceptibilidad al cáncer y la respuesta al tratamiento, pareciera ser específico del tipo de tumor y de la droga suministrada<sup>[28]</sup>. La actividad nula del gen *GSTT1* se ha asociado a efectos secundarios adversos y toxicidad en tratamientos quimioterápicos para el cáncer con drogas citostáticas; la toxicidad resulta del *clearance* insuficiente de la droga mediante la conjugación con GSH.

Si bien las enzimas GSTs juegan un rol importante en la detoxificación celular, su actividad en tejidos cancerosos se ha asociado al desarrollo de resistencia a agentes quimioterápicos que son sustratos de las GSTs. Muchas drogas anticancerígenas son efectivas porque inician la apoptosis o la muerte celular, lo que se halla vinculado a la activación de las MAP quinasa, tales como MAPK8 y p38. Varios estudios han demostrado que la sobreexpresión de GSTs está asociada a la resistencia a la apoptosis y la inhibición de la actividad de las MAP quinasa. En una variedad de tumores, los niveles de GSTs están sobreexpresados, llevando a una reducción en la actividad de MAP y reduciendo así la eficacia de la quimioterapia<sup>[27]</sup>.

## RITMOS CIRCADIANOS

### Generalidades

La vida es un fenómeno rítmico. La actividad y las funciones de los seres vivos se manifiestan como variaciones periódicas o rítmicas; a estas variaciones se las conoce como ritmos biológicos<sup>[40]</sup>. En la naturaleza se observan diversos ritmos biológicos, aquellos con una periodicidad menor a 24 horas se denominan ultradianos, como son la ingesta de alimentos y el ritmo cardíaco. Los ritmos biológicos con una periodicidad mayor a un día se denominan infradianos, como es el caso del ciclo menstrual en los primates, el ciclo estral en roedores, y la hibernación. Por otra parte, los ritmos biológicos con una periodicidad cercana a las 24 horas (similar al ritmo de la rotación de la Tierra sobre su eje), son denominados circadianos (del latín *circa*, “cercano, alrededor de” y *diem*, “día”), por ejemplo, el ciclo de actividad/reposo, y la liberación de ciertas hormonas. Estos ritmos son generados de manera endógena por un reloj circadiano, el cual es sincronizado por ciclos ambientales, principalmente el ciclo diario de luz:oscuridad.

El reloj circadiano está determinado genéticamente y está presente en todo el árbol de la vida, desde organismos unicelulares procariotas hasta mamíferos y plantas superiores. Tiene gran importancia adaptativa, ya que modela en el organismo una representación del tiempo externo, estableciendo una concordancia entre los sucesos del ambiente y la organización de las funciones biológicas, preparando al organismo para responder a condiciones ambientales predecibles<sup>[40]</sup>.

Varias propiedades del reloj circadiano son comunes a todas las especies: 1) es endógeno, ya que persiste en ausencia de señales ambientales, una condición denominada “*free-running*” o libre curso; 2) oscila con un periodo cercano a las 24 horas, aunque se encuentra variabilidad entre las especies; 3) puede ser sincronizado por señales del ambiente; 4) compensa variaciones de temperatura, es decir, es capaz de mantener un periodo constante a través de un rango definido de temperaturas.

A pesar que estas características enfatizan la estabilidad del reloj, éste debe responder a los cambios diarios en el ambiente para ser de utilidad. La sincronización del reloj, para que el tiempo interno coincida con el tiempo local -

del ambiente-, se logra a través de señales (llamadas *zeitgebers* o “dadores de tiempo”) tales como cambios cíclicos en la intensidad de la luz, temperatura, y disponibilidad de nutrientes<sup>[41]</sup>. La señal ambiental que afecta predominantemente al reloj es la luz, por lo que la mayoría de los ritmos se sincronizan al ciclo diario de luz-oscuridad, aún cuando la periodicidad del reloj endógeno no es igual a 24 horas. Esto significa que los organismos deben reajustarse todos los días, de manera de permanecer sincronizados<sup>[42]</sup>.

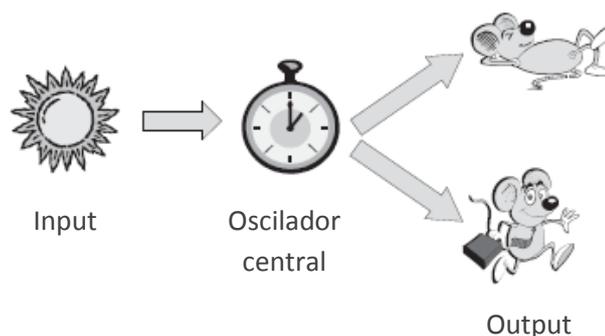
La principal tarea del sistema circadiano es la optimización tanto del metabolismo como del uso de la energía, para mantener una homeostasis diaria en los procesos vitales del organismo. Por ello, gran parte de la fisiología rítmica de los mamíferos está coordinada por un marcapasos circadiano central localizado en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo<sup>[43]</sup>. Por ejemplo, la actividad y el reposo, el ritmo cardíaco, la presión sanguínea, los flujos plasmáticos en riñón e hígado, la producción de bilis y orina, la peristalsis intestinal, la secreción de enzimas digestivas hacia el tracto gastrointestinal y las principales funciones endocrinas son todas objeto de oscilaciones diarias controladas por este reloj<sup>[44]</sup>.

El reloj circadiano se presenta, en cultivos disgregados de neuronas de los NSQ, como una característica independiente y autosostenida en cada célula (“*cell-autonomous*”). Como corolario, puede decirse que los organismos multicelulares tienen relojes funcionales en varios tipos celulares<sup>[41]</sup>. De hecho, como se verá más adelante, el sistema circadiano tiene una estructura jerárquica: un oscilador central regula innumerables osciladores en los tejidos periféricos<sup>[45]</sup>.

### **Componentes del reloj circadiano**

Los estudios realizados hasta el momento han establecido tres componentes en el sistema circadiano: el oscilador o reloj central que genera los ritmos ubicado en los NSQ del hipotálamo, vías de entrada (*input*) que reciben y retransmiten las señales ambientales sincronizando el oscilador, y componentes de salida (*output*) que llevan las señales del reloj central al resto del organismo (Fig. 3). Existen, por otra parte, osciladores periféricos localizados en numerosos tejidos. Esta organización implica que los ritmos circadianos en el comportamiento y la fisiología del organismo pueden resultar

de señales humorales o neuronales, que provienen directa o indirectamente del oscilador central, interactuando con ritmos en la expresión génica o en la actividad enzimática gobernados por relojes locales en tejidos periféricos<sup>[44]</sup>.

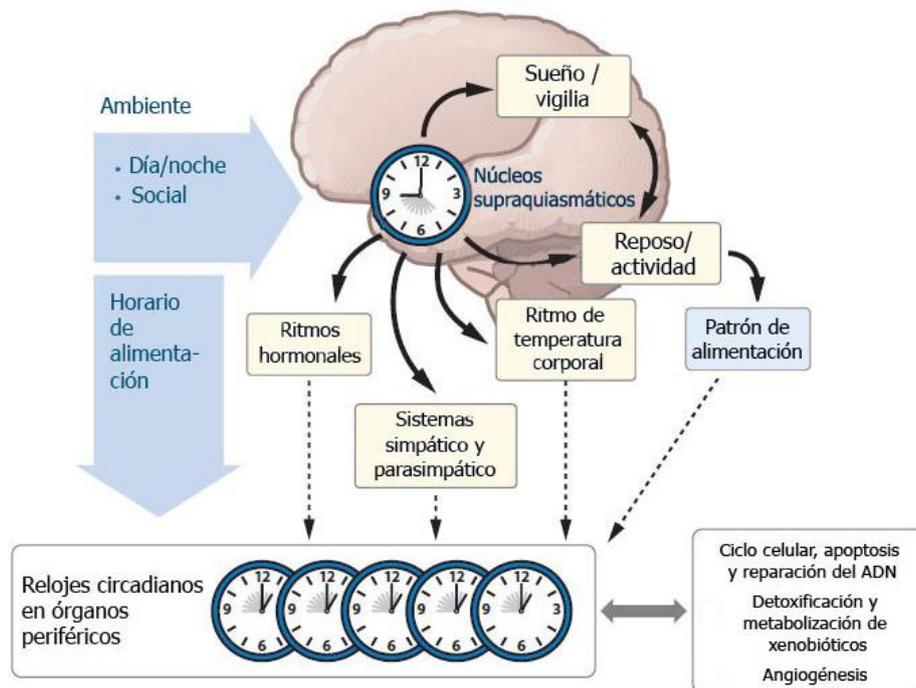


**Figura 3: Componentes del sistema circadiano.**  
(Extraído de <sup>[42]</sup>)

Los NSQ regulan en forma circadiana funciones neurovegetativas a través de conexiones sinápticas hacia varios núcleos hipotalámicos y extrahipotalámicos, tanto mediante salidas neuroendócrinas hacia la hipófisis como mediante el sistema nervioso autónomo<sup>[46]</sup>. Cada neurona del NSQ contiene su propio oscilador, por lo que éstas están acopladas por señales sinápticas y parácrinas para permanecer sincronizadas con una periodicidad emergente. Los ciclos de luz-oscuridad son el *zeitgeber* principal para los NSQ: las señales lumínicas son detectadas por la retina<sup>[47]</sup>, y son transmitidas por sinapsis glutamatérgicas a las neuronas del NSQ vía el tracto retino-hipotalámico<sup>[48]</sup>. Otras regiones como el tálamo, también transmiten estímulos no lumínicos, tales como la presencia o ausencia de alimentos, o la presencia de estímulos novedosos.

Los ciclos de alimentación-ayuno parecen ser los principales *zeitgebers* para algunos osciladores periféricos del sistema gastro-entero-hepático<sup>[49]</sup>. Bajo condiciones de ciclos de alimentación restringida, éstos últimos son capaces de experimentar grandes desplazamientos de fase<sup>d</sup> respecto al oscilador central, sin afectarlo. Los ritmos de temperatura corporal también contribuyen a la sincronización de los relojes periféricos<sup>[50]</sup>. La figura 4 integra los conceptos presentados acerca del sistema circadiano, y agrega otros que se verán a continuación.

<sup>d</sup> La fase corresponde al momento en que la variable adquiere un valor determinado, pudiendo utilizarse como marcador de fase cualquier punto del ritmo.



**Figura 4: Representación esquemática del sistema circadiano.** Éste se compone de: a) el marcapasos hipotalámico (NSQ), b) *outputs* fisiológicos generados por los NSQ, c) factores ambientales que sincronizan el reloj, y d) relojes en las células de los tejidos periféricos. En períodos de 24 horas, los relojes moleculares controlan rítmicamente el metabolismo xenobiótico y la detoxificación, el ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN y la angiogénesis. (Modificado de <sup>[199]</sup>)

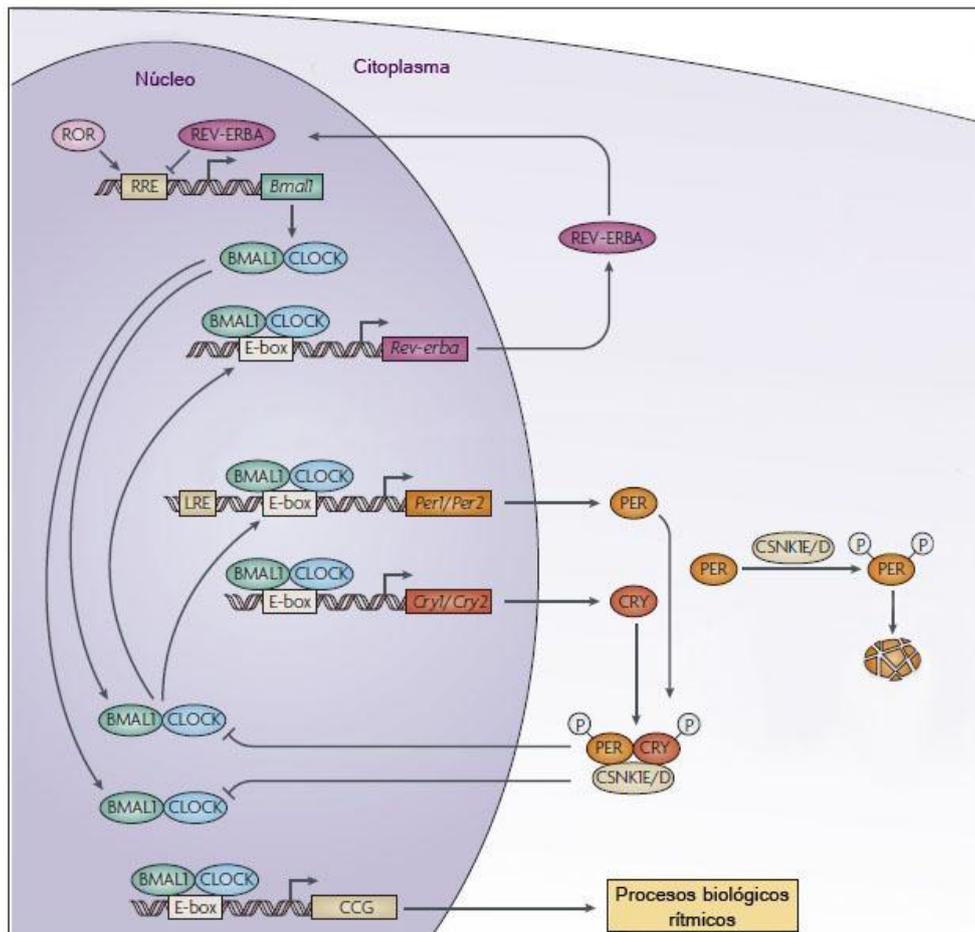
## El mecanismo molecular del reloj

Las oscilaciones diarias en los procesos fisiológicos y conductuales, tanto en plantas como animales, han sido observadas durante miles de años. Sin embargo, en 1960 se descubrió que estos ritmos están regulados genéticamente<sup>[51]</sup>. En la actualidad, se reconocen nueve genes reloj: *CLOCK*, *BMAL1*, *NPAS2*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY1*, *CRY2* y *CSNK1E/D*<sup>[42]</sup>. Los genes *CLOCK* (circadian locomotor output cycles kaput/clock circadian regulator) y *BMAL1* (brain-muscle ARNT-like protein 1/ *ARNTL*, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like) codifican factores de transcripción con dominios bHLH-PAS (*basic-helix-loop-helix/PER-ARNT-SIM*), que son capaces de unirse a secuencias de cajas E (*E-box*). *NPAS2* (neuronal PAS domain protein 2) es un parólogo de *CLOCK* que no se expresa en los NSQ, pero sí en tejidos periféricos. Los tres genes *PER* (period circadian clock) codifican proteínas con dominios PAS, que funcionan como superficies de heterodimerización para otras proteínas reloj. *CRY1-2* (cryptochrome circadian clock/cryptochrome

photolyase-like) codifican proteínas similares a los receptores de luz azul en plantas (fotoliasas de clase I), y forman heterodímeros con las proteínas PER, estabilizándolas; los criptocromos podrían tener también alguna función en la fotorecepción, como ocurre en las plantas y las moscas. CSNK1E/D (casein kinase I  $\epsilon/\delta$ ) fosforila las proteínas PER, afectando su estabilidad y localización celular; también fosforila a CRY y BMAL1. Una característica común de los genes circadianos es que sus niveles de ARNm y proteína oscilan a lo largo de un período de 24 horas, a excepción de CLOCK y CSNK1.

En general, los procesos oscilatorios tienen como base bucles de retroalimentación negativa, con demoras durante el ciclo. En todos los relojes ocurre una importante retroalimentación negativa a nivel transcripcional: factores de transcripción inducen la expresión de otros genes reloj que luego actúan regulando negativamente su propia transcripción, creando así patrones oscilantes de expresión génica<sup>[41]</sup>. Aunque en principio sólo es necesario que un componente del bucle oscile, en todos los relojes descritos hasta el momento, todos los elementos negativos y algunos elementos positivos oscilan a nivel de ARNm y/o proteína. Además, al menos un componente negativo exhibe una demora significativa entre los niveles máximos de ARNm y de proteína. Esto sugiere que la regulación post-transcripcional es fundamental para un adecuado control del reloj.

El bucle de retroalimentación implicado en el reloj consta de una rama positiva y una rama negativa (Fig. 5)<sup>[52]</sup>. El asa de señales positiva involucra a los factores de transcripción *BMAL1*, *CLOCK* y *NPAS2*, mientras que la negativa a *PER* y *CRY*. Al inicio del día, la transcripción de los genes *PER* y *CRY* es activada por los heterodímeros BMAL1:CLOCK o BMAL1:NPAS2, los cuales se unen a secuencias reguladoras *E-box* (secuencia CACGTG) localizadas en los promotores de los genes *PER* y *CRY*. Los mensajeros de estos genes son traducidos en el citosol. Hacia la mitad del día circadiano (comienzo de la noche subjetiva tanto en organismos diurnos como nocturnos), las proteínas PER y CRY se asocian y forman heterodímeros PER:CRY, los cuales son fosforilados por la enzima CSNK1 para después ser traslocados al núcleo, donde se acumulan. Los heterodímeros PER:CRY secuestran BMAL1:CLOCK/NPAS2, interfiriendo con su unión al sitio promotor de *PER* y *CRY*, inhibiendo así su transcripción. PER y CRY eventualmente sufren



**Figura 5: Principales bucles de retroalimentación a nivel transcripcional/traduccional en el reloj circadiano de los mamíferos.** (Modificado de <sup>[52]</sup>)

degradación mediada por CSNK1, con lo que los niveles de PER y CRY disminuyen su concentración hasta valores por debajo de los requeridos para su autorrepresión, y un nuevo ciclo comienza. Los heterodímeros BMAL1:CLOCK/NPAS2 también activan la transcripción del gen que codifica para el receptor huérfano nuclear *REV-ERB $\alpha/\beta$*  (*NR1D1*, nuclear receptor subfamily 1 group D member 1). Una vez en el núcleo, la proteína *REV-ERB $\alpha/\beta$*  se une al promotor de *BMAL1* y reprime su transcripción, provocando la caída de los niveles de ARNm de *BMAL1*. Por otro lado, cuando los dímeros PER:CRY entran al núcleo e inhiben la transcripción de sus propios genes, también inhiben la transcripción de *REV-ERB*, e indirectamente estimulan la transcripción de *BMAL1*. En ausencia de *REV-ERB $\alpha/\beta$* , la proteína ROR (RAR related orphan receptor) se une al promotor de *BMAL1* y activa su transcripción. En consecuencia, los niveles de BMAL1 aumentan al final de la

noche, favoreciendo la formación de BMAL1:CLOCK/NPAS2, con lo que se reinicia el ciclo<sup>[45]</sup>.

Además de participar en el control positivo de la transcripción de *PER* y *CRY*, BMAL1:CLOCK/NPAS2 actúa como factor de transcripción de otros genes que contienen *E-boxes* en sus promotores. A éstos se los denomina genes controlados por el reloj (CCG, *clock-controlled genes*), y constituyen el 2-10% del genoma mamífero. La mayoría de ellos muestran patrones de expresión específicos del tejido u órgano donde se expresan, y están involucrados directamente en la función del órgano. Sin embargo, un pequeño grupo de genes se expresan en múltiples órganos; algunos de ellos codifican reguladores claves de la progresión del ciclo celular<sup>[53]</sup>.

### **El control post-transcripcional**

Múltiples niveles de control post-transcripcional están presentes en el mecanismo del reloj, con los siguientes objetivos: 1) generar ajustes en el ciclo y que éste tome 24 horas completas, 2) mantener una amplitud<sup>e</sup> marcada durante el ciclo, desde la transcripción de los componentes del reloj hasta las vías de salida fisiológicas, y 3) amortiguar los mecanismos del reloj ante los cambios abruptos del ambiente<sup>[41]</sup>. Además, el control post-transcripcional provee mecanismos mediante los cuales el reloj puede reajustarse frente a los *inputs* del ambiente.

Entre los principales mecanismos de control, se hallan: a) el empalme alternativo del ARNm y la estabilización del mismo; b) la poliadenilación; c) la regulación por miARNs; d) el control traduccional, que genera retrasos de varias horas entre el pico de ARN y el de proteína; e) la traducción independiente del Cap; e) el transporte hacia el núcleo de algunos componentes del reloj, especialmente de los elementos negativos, y f) la estabilidad de las proteínas reloj y su dinámica de degradación<sup>[41,54]</sup>.

### **La disrupción del sistema circadiano y el cáncer**

La alteración del sistema circadiano tiene profundas influencias en la

---

<sup>e</sup> La amplitud es la diferencia entre el valor máximo de la variable y el mesor (valor medio que toma la variable a lo largo del ritmo).

salud humana. Estudios epidemiológicos revelan que aquellos individuos cuyas profesiones tienen patrones de actividad que alteran la sincronización circadiana normal, tienen mayor riesgo de padecer algunos desórdenes<sup>[55]</sup>. De hecho, la *IARC* ha clasificado al “trabajo en turnos rotativos con disrupción del ritmo circadiano” como probablemente carcinogénico para los humanos (grupo 2A)<sup>f[56]</sup>. En el otro sentido, ciertas patologías crónicas como el insomnio, trastornos estomacales, problemas cardíacos y depresión, u oncológicos, generan alteraciones circadianas<sup>[53]</sup>. Cabe destacar en los pacientes con cáncer, la presencia de desórdenes de sueño, fatiga, depresión, pérdida del apetito y alteraciones cognitivas, cambios denominados en conjunto como *sickness behavior*<sup>[57]</sup>.

En estudios experimentales con ratones, la disrupción del sistema circadiano se asoció a un crecimiento acelerado de tumores malignos, sugiriendo que el reloj del hospedador juega un rol importante en el control endógeno de la progresión tumoral<sup>[58]</sup>. Estudios epidemiológicos muestran que alteraciones exógenas de los ritmos por cambios en las condiciones ambientales de sincronización (ya sea por trabajo nocturno o por *jet lag* crónico -JLC-), aumentan el riesgo de contraer cáncer<sup>[59-62]</sup>. Recíprocamente, las manipulaciones ambientales o conductuales destinadas a incrementar la amplitud de los ritmos circadianos, podrían mejorar la calidad de vida de los pacientes.

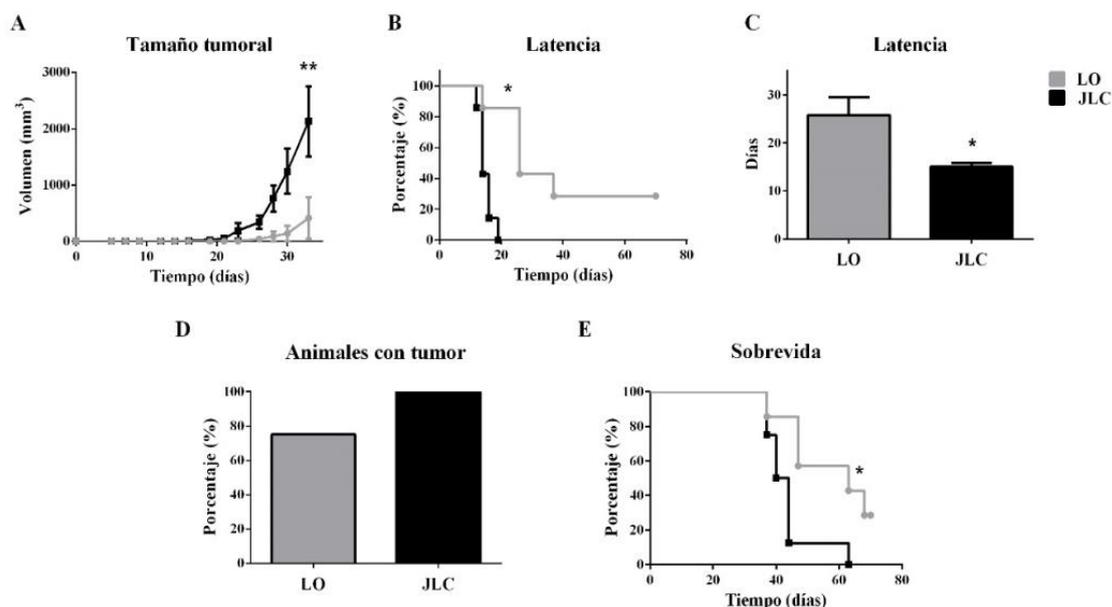
### **Protocolo de desincronización forzada por *jet lag* crónico en un modelo animal**

El grupo colaborador de la Universidad Nacional de Quilmes ha caracterizado un modelo murino de desincronización forzada por JLC<sup>[63]</sup>, el cual ha sido utilizado en esta tesis junto a un protocolo de desarrollo tumoral. Una

---

<sup>f</sup> Grupo 2A: esta categoría indica que existe *limitada evidencia de carcinogenicidad* en humanos, y *suficiente evidencia de carcinogenicidad* en animales experimentales. En algunos casos, un agente se clasifica dentro de este grupo cuando existe *inadecuada evidencia de carcinogenicidad* en humanos y *suficiente evidencia de carcinogenicidad* en animales experimentales, junto a una fuerte evidencia de que la carcinogénesis se produce por un mecanismo que también opera en humanos. Excepcionalmente, un agente se clasificará en este grupo solo con *limitada evidencia de carcinogenicidad* en humanos.

descripción detallada del modelo se encontrará en la sección “Materiales y Métodos” de la Parte I. Brevemente, el protocolo consiste en adelantos de 6 horas del ciclo LD, cada 2 días (alternando una noche de 6 horas seguida de otra de 12 horas). Como resultado, los ratones presentan simultáneamente dos componentes rítmicos de actividad locomotora (de aproximadamente 21 y 25 horas). Además, se ha demostrado en el laboratorio de Cronobiología de la UNQ, que los ratones bajo JLC incrementan anormalmente su peso y presentan alteraciones en el metabolismo lipídico, aunque mantienen una ingesta diaria normal de alimento<sup>[63,64]</sup>. Resulta relevante mencionar aquí que la implantación de células B16-F0 (línea celular de melanoma murino) en los flancos de los animales, generó un mayor desarrollo tumoral en aquellos ratones bajo JLC respecto de los mantenidos en condiciones estándar de luz-oscuridad. Esto fue observado tanto en la latencia y porcentaje de toma del tumor, como en el tamaño alcanzado y la sobrevida de los animales en el punto final experimental (datos no publicados, tesis de licenciatura de Fernanda Román, Laboratorio de Cronobiología, UNQ, 2016). La figura 6 muestra los



**Figura 6: Caracterización del crecimiento tumoral en condiciones de LO (luz-oscuridad) y JLC.**

A) Media + error estándar de la media (EEM) del tamaño tumoral (mm<sup>3</sup>), B) porcentaje y C) media + EEM de la latencia tumoral (días), D) porcentaje de animales con tumor, E) porcentaje de sobrevida, en ratones macho C57BL/6 inyectados subcutáneamente con 30000 células B16-F0. A) ANOVA medidas repetidas \*\*\*\* p<0.0001, test *a posteriori* LO vs. JLC, \*\*p<0.01; B) test de latencia p=0.006; C) test t-Student, p=0.037; E) test de sobrevida p=0.02. n=8 por condición. Se muestra un experimento representativo. Extraído de la tesis de licenciatura de Fernanda Román, Laboratorio de Cronobiología, UNQ, 2016.

resultados obtenidos con este modelo, que refuerzan la hipótesis sobre el rol del sistema circadiano y su disrupción en la progresión tumoral.

### **El reloj circadiano, el control del ciclo celular y la respuesta frente al daño al ADN**

Varias líneas de investigación indican que el reloj circadiano juega un rol importante en el control del crecimiento celular. En primer lugar, la proliferación celular y la apoptosis en tejidos de rápida renovación están sincronizados en forma circadiana<sup>[65]</sup>. Se cree que el *timing* evolutivamente conservado de la fase S del ciclo celular (antes de la salida del sol), protege al ADN en replicación de los altos niveles de daño por radiación que tiene lugar durante el día<sup>[55]</sup>. Segundo, la proliferación de células tumorales sigue un patrón circadiano autónomo, desfasado del que llevan las células no tumorales. Por otra parte, los genes reloj pueden responder directamente el estrés genotóxico, observable en los pacientes bajo tratamiento radio y quimioterápico.

La exposición inoportuna a luz artificial podría alterar la función del reloj en los NSQ, que luego alterarían la regulación del ciclo celular en los tejidos periféricos. Este impacto de la luz artificial sobre el oscilador central puede ser modificado, ya sea por variantes genéticas en aspectos de la fototransducción en la retina, o por polimorfismos en uno o más genes reloj. De hecho, variantes de los genes *CRY2*, *PER1*, *PER3*, *NPAS2* y *CSNK1E* fueron asociadas a diversos tipos de cáncer, como linfomas No-Hodgkin, cáncer de próstata y cáncer de mama<sup>[66–71]</sup>.

Fu & Lee<sup>[53]</sup> sugieren, en base a la evidencia existente, que el reloj circadiano funciona como supresor de tumores *in vivo* a nivel sistémico, celular y molecular.

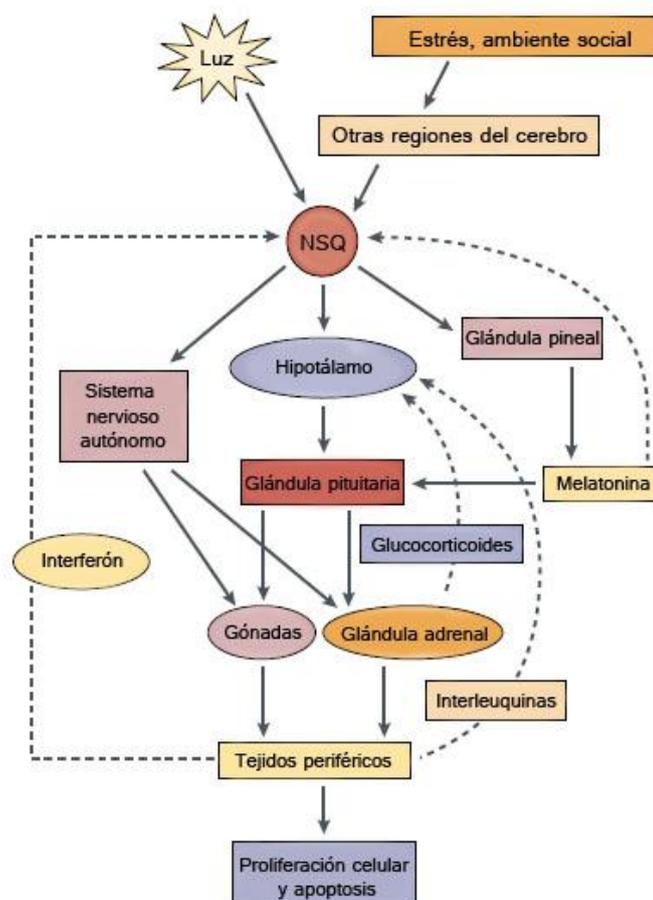
A nivel sistémico (Fig. 7):

Los NSQ regulan la proliferación celular y la apoptosis en los tejidos periféricos a través del sistema nervioso autónomo (SNA) y los sistemas neuroendocrinos (ejes hipotálamo-pituitario-adrenal y hipotálamo-pituitario-gonadal). El SNA controla la proliferación y muerte celular de los tejidos que inerva a través de receptores transmembrana acoplados a proteína G (para acetilcolina, norepinefrina). Las hormonas producidas por los ejes antes

mencionados, como los estrógenos y los glucocorticoides, también controlan dichos procesos celulares en los tejidos periféricos. La actividad del SNA y el sistema neuroendocrino está regulada por el reloj, ya que muestra actividad rítmica durante 24 horas *in vivo*, indicando así que la proliferación celular se halla coordinada temporalmente por el reloj circadiano.

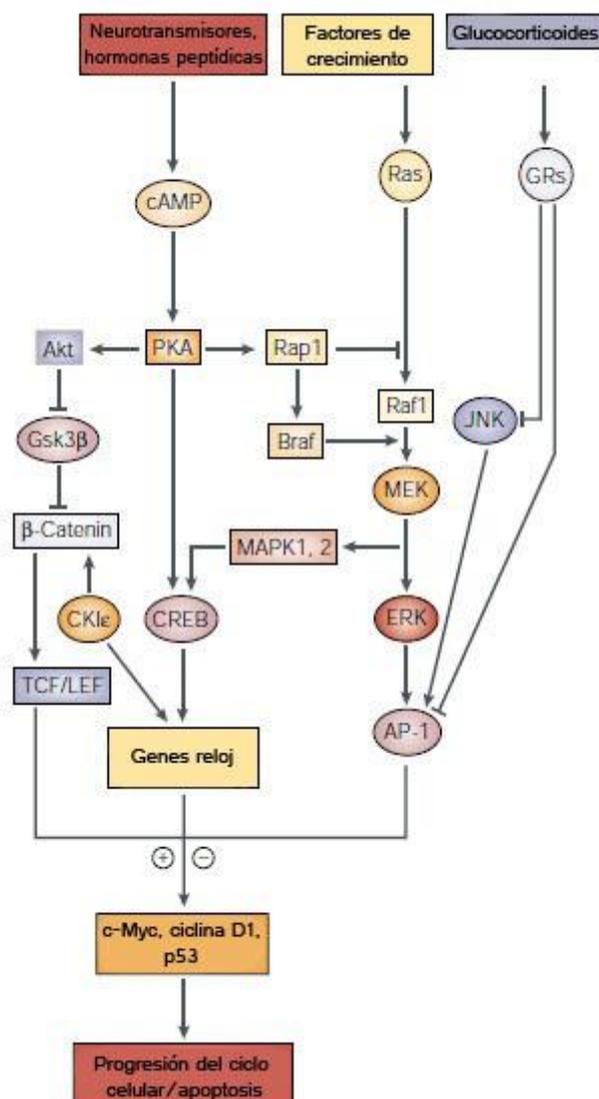
La respuesta inmune también está regulada por el reloj circadiano central. A través del SNA y el sistema neuroendócrino, el reloj regula el desarrollo tumoral, ejerciendo funciones inmunomodulatorias, es decir, controlando la producción de citoquinas y la distribución, proliferación y apoptosis de los leucocitos. La disrupción del sistema circadiano podría entonces llevar a la inmunosupresión, alterando la vigilancia del sistema inmune y promoviendo el desarrollo tumoral.

**Figura 7: Control de la proliferación celular y la apoptosis a nivel sistémico, por parte del reloj circadiano.** La luz y otros factores ambientales alcanzan los NSQ a través de varias vías de entrada. El reloj se sincroniza con el ambiente y genera ritmos endógenos, que se transmiten por vías de salida hacia los tejidos periféricos. En la figura se muestran algunas rutas de salida representativas, como el sistema nervioso autónomo, y los ejes hipotálamo-pituitario-adrenal y hipotálamo-pituitario-gonadal. La glándula pineal y los tejidos periféricos retroalimentan los NSQ, regulando la homeostasis. La melatonina, producida por la glándula pineal, se une a receptores en las neuronas de los NSQ e induce corrimientos de fase. Las glándulas adrenales producen glucocorticoides, que tienen un efecto negativo sobre el hipotálamo, deteniendo la liberación de hormona liberadora de corticotropina. Los productos de la actividad inmune, como interferón e interleuquinas, también pueden modular la actividad de los NSQ y del eje hipotálamo-pituitario-adrenal. Las líneas punteadas indican rutas de retroalimentación. (Modificado de <sup>[53]</sup>)



A nivel celular y molecular (Fig. 8)

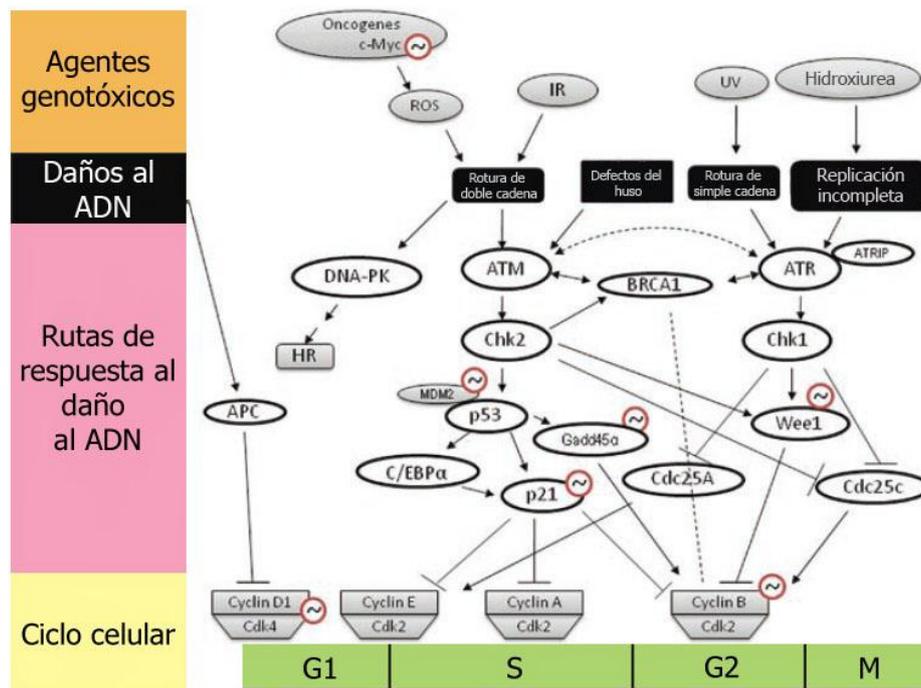
Los NSQ controlan la proliferación celular y la apoptosis en las células de los tejidos periféricos, a través de la regulación de la expresión de los genes controlados por el reloj. Estudios recientes muestran que cerca del 7% de los CCG que fueron identificados en roedores regulan la proliferación celular o la apoptosis. Este grupo de genes incluye a *MYC* (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog), *CDKN1A* (cyclin dependent kinase inhibitor 1A), *WEE1* (WEE1 G2 checkpoint kinase), *MDM2* (transformed mouse 3T3 cell double minute 2/MDM2 proto-oncogene), *TP53* (tumor protein p53) y *GADD45A* (growth arrest and DNA damage inducible alpha), así como a genes que codifican caspasas, ciclinas, factores de transcripción y factores asociados a ubiquitina, involucrados en el control del ciclo celular y la apoptosis. La mayoría de los puntos de intersección entre el sistema circadiano y el ciclo celular



**Figura 8: Rutas de señalización entre el reloj circadiano y la regulación del ciclo celular en tejidos periféricos.** El reloj central regula la producción de señales extracelulares, y éstas, en los tejidos periféricos, pueden afectar la progresión del ciclo celular o la apoptosis. Por ejemplo, la producción de factores de crecimiento, regulada por el reloj circadiano, activa las vías de las MAPK (mitogen activated protein kinase), y los neurotransmisores y las hormonas peptídicas activan las vías del cAMP/PKA (protein kinase A). La señalización a través de estas rutas activa las proteínas CREB (c-AMP response-element binding protein), que a su vez activan la transcripción de los principales genes reloj en las células de los tejidos periféricos. Además, ERK (extracellular signal-regulated kinase) activa al factor de transcripción AP1, que regula la producción de MYC, ciclina D1 y p53, y con ello la proliferación celular y la apoptosis. La ruta del cAMP promueve indirectamente la estabilización de β-catenina; el gen reloj CSNK1 también estabiliza β-catenina, activando a TCF/LEF1 (T-cell-specific transcription factor/lymphoid enhancer factor-1). Esto también lleva a la activación de MYC y ciclina D1. Los glucocorticoides pueden inhibir la actividad de AP1 en forma directa a través de los GRs (glucocorticoid receptors), o indirectamente al inhibir la ruta de señalización de JNK. En síntesis, los relojes periféricos y el ciclo celular están íntimamente ligados a través de varias vías de transducción de señales. (Modificado de [53])

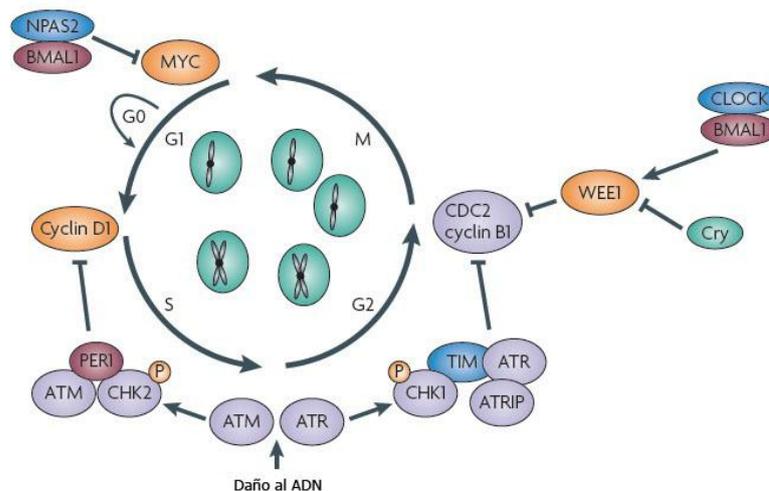
involucran rutas de respuesta al daño al ADN, inducidas por los puntos de control de daño al ADN, así como también por el punto de control de la replicación (transición G1/S) y el punto de control de metafase (fase M). En conjunto, estos datos sugieren que varios reguladores del ciclo celular son blancos del mecanismo del reloj corriente abajo<sup>[55]</sup>.

La evidencia indica que el mecanismo molecular del reloj y del ciclo celular en los tejidos periféricos están regulados por una compleja interacción de vías de señalización que incluye glucocorticoides, retinoides, cAMP, PRKCA (proteín kinase C alpha), WNT, Ca<sup>2+</sup> y MAPK. *In vivo*, la producción de señales extracelulares -como factores de crecimiento, citoquinas, neurotransmisores y hormonas- está regulada por el reloj central en los NSQ. De esta manera, éste controla las actividades en los tejidos periféricos, de forma rítmica dentro del ciclo de 24 horas. Los relojes periféricos, sincronizados por el oscilador central y operando en sus propios contextos, responden a estas señales para regular los genes que dirigen la progresión del ciclo celular. Sin embargo, bajo ciertas



**Figura 9: Uniones identificadas entre el reloj circadiano mamífero y las rutas del ciclo celular.** La parte superior del diagrama muestra los agentes que normalmente causan daño al ADN. Los bloques negros representan los daños que disparan los puntos de control del ciclo celular. La parte media del diagrama muestra varias rutas de respuesta al daño al ADN, y los principales reguladores de estos procesos. La parte inferior muestra los principales puntos de control del ciclo celular y sus reguladores. Los círculos rojos marcan aquellos genes cuya expresión se encuentra bajo control del reloj circadiano. (Modificado de <sup>[55]</sup>)

condiciones, como en el caso de daño al ADN, los relojes periféricos responden inmediatamente y pueden, por lo tanto, operar independientemente del marcapasos central, a fin de examinar localmente los puntos de control del ciclo celular, activar la apoptosis y suprimir el crecimiento tumoral. Las figuras 9 y 10 ponen de manifiesto las interacciones entre el reloj circadiano y el control del ciclo celular, con énfasis en la respuesta frente al daño al ADN.



**Figura 10: Interacciones entre las proteínas reloj, y los reguladores del ciclo celular y la respuesta al daño al ADN.** ATM, ataxia telangiectasia mutated; ATR, ataxia telangiectasia and Rad3-related; ATRIP, ATR-interacting protein; CDC2, cell division cycle 2; TIM, timeless; P, phosphorylation. (Extraído de <sup>[73]</sup>)

Chen & Mcknight<sup>[72]</sup> sostienen que la señal de daño al ADN es la fuerza definitiva que coordina los tres ciclos fundamentales de la vida: el ciclo circadiano, el ciclo celular y el ciclo metabólico.

A pesar de las conexiones observadas entre el sistema circadiano y el ciclo celular, cabe tener en cuenta otras evidencias que sugieren que la relación entre estos dos sistemas no es absoluta. Por ello, Sahar & Sassone-Corsi<sup>[73]</sup> proponen que el control del ciclo celular por parte del reloj circadiano es, más bien, “oportunista”, dependiendo del estado fisiológico de la célula, y debe por ello considerarse como un mecanismo de puesta a punto.

→ El ordenamiento temporal del organismo humano debe ser entendido para apreciar el impacto del trabajo nocturno sobre la salud y el bienestar. El cuerpo humano no solo tiene una estructura en el espacio, visible por su

anatomía macro y microscópica, sino que también tiene una estructura en el tiempo, tal como se expresa en ritmos de diferente frecuencia, superpuestos a las tendencias lineales del desarrollo y el envejecimiento<sup>[56]</sup>.

## RELACIÓN ENTRE EL SISTEMA DE METABOLIZACIÓN DE XENOBIÓTICOS Y EL RELOJ CIRCADIANO EN EL DESARROLLO TUMORAL

El efecto terapéutico y/o la toxicidad de los xenobióticos están influenciados por su absorción, distribución, metabolismo intracelular y eliminación. Todos estos procesos muestran variaciones circadianas<sup>[43]</sup>. Los pasos limitantes de la velocidad, en estas vías metabólicas, son importantes puntos de control efectuados por el reloj circadiano<sup>[74]</sup>. El mecanismo que une la maquinaria celular del reloj y las variaciones rítmicas en la expresión de genes asociados al metabolismo xenobiótico están comenzando a dilucidarse. En forma general, se acepta que: 1) la sensibilidad de las células a los agentes xenobióticos, cambia en paralelo con las variaciones rítmicas de las vías del reloj circadiano que regulan el metabolismo xenobiótico, y 2) la exposición a xenobióticos puede interferir con las señales de entrada habituales que sincronizan el reloj, y con ello alterar su regulación sobre las funciones celulares normales<sup>[75]</sup>.

### Rutas moleculares

Estudios realizados sobre el perfil de transcritos en tejido hepático de ratón y rata, revelan que aproximadamente el 10% de los genes con expresión rítmica, codifican enzimas involucradas en las fases de detoxificación xenobiótica<sup>[76-78]</sup>. De hecho, la mayor parte de los genes que codifican enzimas metabolizantes muestran variaciones circadianas en su expresión<sup>[77,79]</sup>. Además, estas oscilaciones se pierden al interrumpir los genes principales reguladores del ritmo, tales como CLOCK y CRY<sup>[80]</sup>.

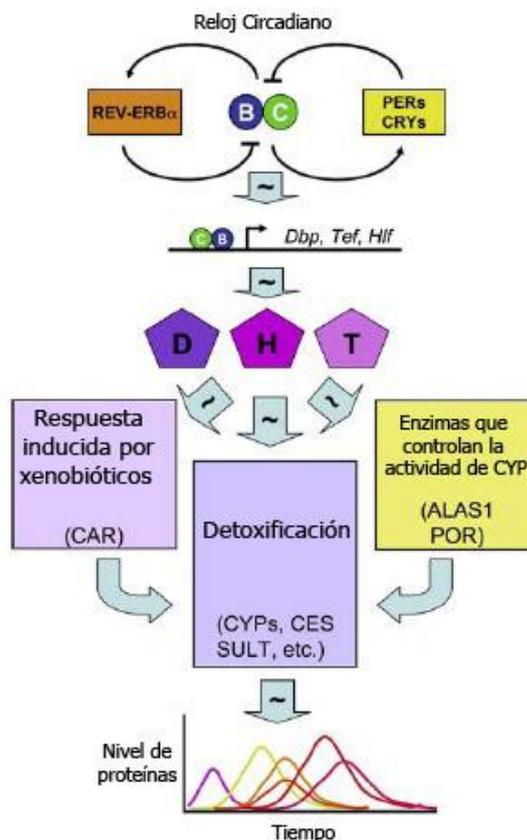
Dentro de los GMX que siguen patrones de expresión circadianos, se incluyen las subfamilias del citocromo P450, UDP-glucuronosiltransferasas, glutatión S-transferasas, y glicoproteína P, entre otros. El mecanismo propuesto para este patrón de expresión involucra factores de transcripción controlados por el reloj. Tal es el caso de los receptores nucleares que detectan xenobióticos<sup>[75]</sup>. CAR (constitutive androstane receptor), PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) y AHR/ARNT (aryl

hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) son factores de transcripción activados por ligando, que regulan la expresión de numerosas EMX de fase I y II, así como genes transportadores de fase III, involucrados en el metabolismo y el *clearance* de xenobióticos y hormonas esteroideas.

Además de CAR, PPARA y AHR/ARNT, los factores PARbZip (proline and acidic amino acid-rich basic leucine zipper) parecen jugar un rol fundamental<sup>[81]</sup>. La familia de factores de transcripción PARbZip está compuesta por 3 miembros: DBP (albumin D box-binding protein), HLF (hepatic leukemia factor) y TEF (thyrotrophic embryonic factor). Éstos están entre las proteínas más

conservadas dentro de los mamíferos; se unen al ADN en secuencias consenso 5'-RTTAYGTAAY-3' (donde R es una A o G, e Y es una C o T) en forma de homo- o heterodímeros, y se expresan en forma circadiana en hígado, riñón e intestino delgado, tres tejidos particularmente relevantes para la detoxificación de xenobióticos. También se acumulan en varias zonas del cerebro, aunque con amplitudes circadianas menores. Los factores de transcripción PARbZip regulan la expresión de muchos genes involucrados en la detoxificación, incluyendo a las EMX (Fig. 11). Son, por lo tanto, componentes de salida del sistema circadiano<sup>[44]</sup>.

Otro nivel de regulación por parte de la maquinaria circadiana se logra a través de la remodelación de la cromatina<sup>[82]</sup>. CLOCK posee actividad histona-acetiltransferasa (HAT), esencial para la expresión circadiana de los CCG. La actividad enzimática de CLOCK también le permite acetilar sustratos no-

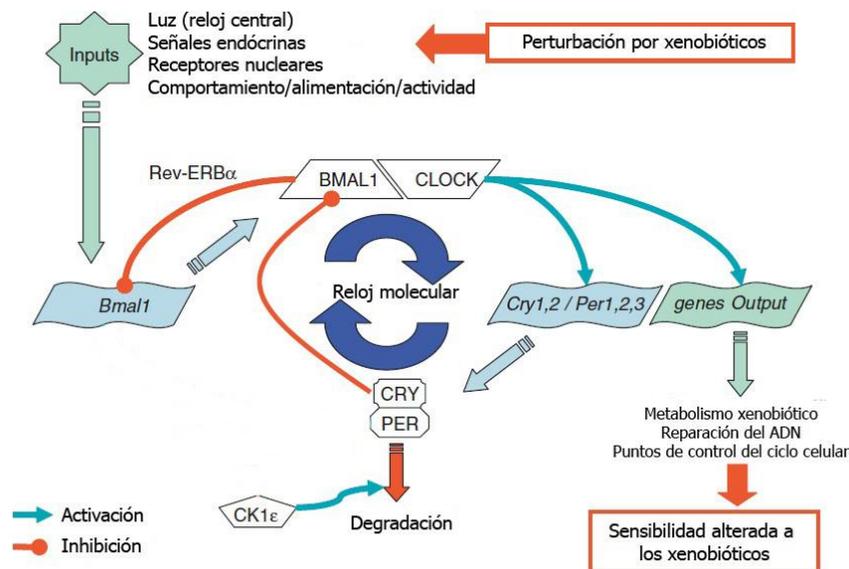


**Figura 11: El reloj circadiano regula una cascada de expresión génica coordinada temporalmente, que es necesaria para la adecuada respuesta frente a los xenobióticos.** Como resultado, se producen en el momento apropiado aquellas proteínas requeridas para el metabolismo xenobiótico. (Modificado de <sup>[74]</sup>)

histonas. Recientemente se identificó a la histona deacetilasa SIRT1 (sirtuin1), como un modulador crucial de la maquinaria circadiana. SIRT1 regula los ritmos al contrarrestar la actividad HAT de CLOCK, operando como un reóstato que modula la amplitud y la “estrechez” de la acetilación mediada por CLOCK, y en consecuencia, los ciclos de transcripción en los tejidos metabólicos<sup>[82]</sup>. La actividad acetiltransferasa de CLOCK junto a la actividad deacetilasa de SIRT1, parecen regular e integrar el reloj circadiano al metabolismo. Perturbaciones en la expresión o la actividad de estos reguladores podrían contribuir al desarrollo del cáncer al causar una proliferación descontrolada y defectos en vías metabólicas.

### Perturbación del reloj por compuestos xenobióticos

Actualmente se cuenta con evidencia que sostiene que los xenobióticos pueden perturbar al sistema circadiano. A nivel molecular, la exposición a estos compuestos puede alterar significativamente la expresión de los genes reloj a través de varias vías, principalmente AHR y PPARA<sup>[19]</sup>. Al generar disturbios en el reloj, y con ello en la expresión circadiana de los GMX, algunos xenobióticos pueden modificar su propio ritmo diario de metabolización y así, su toxicidad<sup>[19]</sup> (Fig. 12).



**Figura 12: Maquinaria molecular del reloj y su interrelación con la exposición a xenobióticos.** Un grupo de genes que forman parte de las vías de salida del reloj están involucrados en el metabolismo xenobiótico, y pueden por ello alterar la sensibilidad a estos compuestos. Por otra parte, varios *inputs* diferentes (incluyendo las rutas de señalización mediadas por receptores nucleares) pueden modular los componentes del reloj principal. Las perturbaciones en estas vías, producidas por xenobióticos, pueden alterar el funcionamiento del reloj y así, desregular un número de funciones celulares, incluyendo los puntos de control del ciclo celular. (Modificado de <sup>[75]</sup>)

La alteración de la expresión génica del reloj por agentes xenobióticos, podría representar parte del mecanismo general que regula el *timing* de la progresión del ciclo celular<sup>[75]</sup>.

### **Sistema de EMX + tiempo = heterogeneidad en la respuesta a los xenobióticos**

La forma en que los individuos responden a los medicamentos, en términos de toxicidad y eficacia del tratamiento, y a los xenobióticos en general, es muy diversa. Actualmente se reconoce que las diferencias heredadas en el metabolismo y la disponibilidad de drogas, así como en los polimorfismos genéticos para las EMX, pueden tener una influencia aún mayor en la eficacia y la toxicidad de estos compuestos<sup>[23]</sup>. Sin embargo, estas diferencias genéticas en el sistema de metabolización no son la única causa de variación en el efecto de los xenobióticos. Se han demostrado cambios a lo largo de las 24 horas en todos los procesos farmacocinéticos determinantes de la biodisponibilidad de cientos de drogas, tanto en roedores como en humanos<sup>[83]</sup>. Se registraron además, cambios entre 2 a 10 veces en la tolerancia a 35 drogas anticancerígenas como función del tiempo de administración de las mismas<sup>[44]</sup>. Puede decirse, por lo tanto, que la manera en que funciona el reloj circadiano es fundamental para definir la respuesta individual frente a la exposición a xenobióticos.

La conexión observada entre la disrupción circadiana y el riesgo de cáncer en los estudios epidemiológicos, derivó en la hipótesis de los genes circadianos<sup>[84]</sup>, la cual sugiere que las variantes genéticas de los genes componentes del reloj circadiano, pueden afectar la susceptibilidad individual al cáncer. Esta hipótesis está apoyada por los resultados de estudios de asociación genética, en cáncer de mama, próstata y linfoma no-Hodgkin. Como se mencionó anteriormente, el riesgo de algunos cánceres también se asoció a polimorfismos en EMX, resultantes en un deterioro de la capacidad para inactivar moléculas mutágenas endógenas o exógenas. Dada la estrecha relación entre el reloj circadiano y los procesos metabólicos, es posible que los polimorfismos en los genes clave de ambos sistemas, tengan un impacto en la manera en que son metabolizados los compuestos carcinogénicos, y en consecuencia, en el riesgo de desarrollo tumoral. Debe tenerse en cuenta que,

en contraste con los cambios rítmicos y consistentes que ocurren en los tejidos normales, los tumores presentan heterogeneidad en lo que respecta a expresión génica del reloj y al ritmo que siguen los determinantes farmacológicos, según el tipo de tumor y su estado<sup>[44]</sup>.

Futuras investigaciones en el campo de la cronobiología y la farmacogenética, acerca de las posibles interacciones entre las variantes de los genes circadianos y la exposición ambiental (xenobióticos, *light at night*, trabajo en turnos nocturnos, etc.), serán de utilidad para desarrollar estrategias de prevención del cáncer en estas poblaciones de riesgo.

## HIPÓTESIS

Considerando que:

- Existen antecedentes que muestran asociaciones significativas entre determinadas variantes alélicas de GMX y genes reloj, y un aumento en el riesgo de desarrollo tumoral,
- Existen evidencias que respaldan una estrecha relación entre el sistema circadiano, el metabolismo xenobiótico y el cáncer,
- El estilo de vida y otros factores ambientales contribuyen significativamente al desarrollo del cáncer,
- Los pacientes oncológicos atraviesan fuertes demandas físicas y emocionales, con alteraciones en el sistema circadiano y en otros aspectos de su funcionalidad,

se postulan las siguientes hipótesis:

- a) Los genes reloj y los GMX presentarán alteraciones en el patrón diario normal de expresión, en ratones bajo desincronización circadiana. Estas alteraciones podrían explicar el mayor desarrollo tumoral en los animales del modelo de estudio.
- b) Los genes reloj y los GMX presentarán alteraciones en el patrón diario normal de expresión en ratones portadores de tumores, bajo condiciones normales de sincronización.
- c) Determinadas variantes alélicas de genes reloj se asociarán a un aumento en el riesgo de cáncer, e influirán en la funcionalidad del individuo que porta la variante.
- d) Determinadas variantes alélicas de GMX, algunos hábitos dietarios y el tabaquismo se asociarán a un aumento en el riesgo de cáncer.

## OBJETIVOS

El *objetivo general* busca analizar los patrones de expresión de genes reloj y GMX en un modelo animal de desarrollo tumoral, bajo condiciones normales o de desincronización circadiana, así como también evaluar la asociación entre el cáncer y variantes alélicas de estos mismos genes, hábitos dietarios, tabaquismo y funcionalidad del paciente, a través de un diseño caso-control. Se pretende dilucidar aspectos del rol del reloj circadiano en el desarrollo tumoral, la participación de los GMX y los genes reloj en el riesgo de enfermedad oncológica, y la relación de estas variables con factores ambientales, aumentando así el conocimiento disponible para mejorar los tratamientos e identificar poblaciones con mayor riesgo. Además, se busca aumentar la información disponible sobre estos factores genéticos y ambientales, para el cáncer hematológico -en particular-, y para nuestra población argentina.

### *Objetivos particulares:*

1) Determinar las variaciones diarias en los niveles de expresión de los genes reloj *Bmal1*, *Per1* y *Per2*, y de los GMX *Cyp1a1*, *Gstt1* y *Nat1*, en un modelo murino de desarrollo tumoral, bajo condiciones normales o de desincronización forzada por JLC.

2) a. Analizar el polimorfismo de longitud del gen *PER3* en muestras de tumores humanos (hematológicos) y en muestras control, y evaluar su asociación con el cáncer.

b. Analizar distintas variables de funcionalidad en pacientes con cáncer hematológico y en pacientes control, e indagar sobre posibles interacciones entre estas variables y el gen reloj *PER3*.

3) a. Determinar los genotipos de los GMX *CYP1A1* (variante \*2A), *GSTT1* y *GSTM1* (deleciones) en muestras de tumores humanos (hematológicos) y en muestras control, y analizar su asociación con el cáncer.

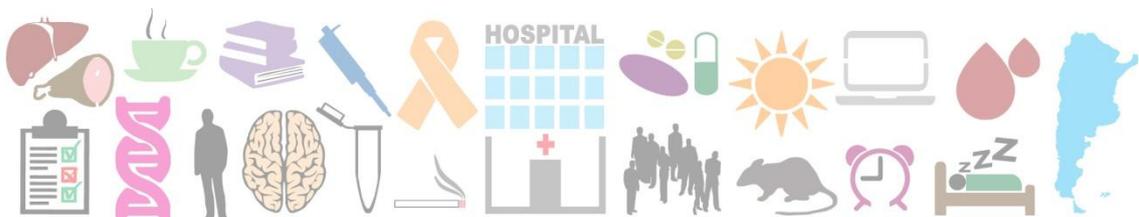
b. Analizar la posible asociación entre el cáncer hematológico, el tabaquismo y algunos hábitos dietarios, e investigar las potenciales interacciones entre estos factores y los genotipos de GMX en el riesgo de enfermedad.

\* A fin de facilitar la lectura y organización de esta tesis, el objetivo particular n°1 se aborda en la Parte I, mientras que los objetivos particulares restantes (2a, 2b, 3a, 3b) se tratan en la Parte II. Cada parte cuenta con las secciones “Materiales y métodos”, “Resultados”, “Discusión” y “Conclusiones parciales”.

# PARTE I

## INTERACCIÓN BIDIRECCIONAL ENTRE EL SISTEMA CIRCADIANO Y EL PROCESO TUMORAL

**Análisis de los niveles de expresión de ARNm de genes reloj y GMX en NSQ, hígado y tumor en un modelo murino de desincronización circadiana y desarrollo tumoral**



## MATERIALES Y MÉTODOS

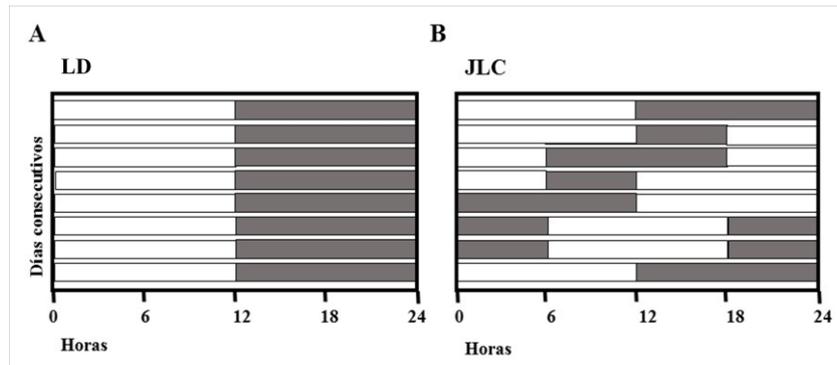
### Modelo animal

Se utilizaron ratones machos C57BL/6 (*Mus musculus*) de 8 a 14 semanas de edad, adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) bajo un ciclo LD (*Light:Dark* 12 h:12 h), con temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y ventilación controladas, y bebida y alimento balanceado *ad-libitum*. Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

- 1) animales sanos, bajo condiciones de:
  - a) LD 12:12
  - b) jet lag crónico
- 2) animales inoculados subcutáneamente con línea celular tumoral B16-F0, bajo condiciones de:
  - a) LD 12:12
  - b) jet lag crónico

La desincronización forzada del ritmo de actividad general puede inducirse con protocolos de *jet lag* crónico (JLC) experimental, obligando a una resincronización permanente del reloj circadiano. En este trabajo, el protocolo de JLC consistió en avances de 6 horas cada 2 días del ciclo LD<sup>[63]</sup>, comenzando 3 semanas antes de inocular los animales, y continuándolo hasta el momento del sacrificio. La exposición a JLC induce la presencia de dos componentes rítmicos de actividad locomotora, uno con la misma periodicidad emergente del protocolo de JLC, 21 horas, y otro aproximado al período circadiano en condiciones constantes de los ratones, 25 horas. Los protocolos LD y JLC se describen gráficamente en la figura 13.

Al alcanzar el punto final experimental (ver abajo), para ambos protocolos los animales fueron expuestos durante un día en oscuridad constante (DD, *Dark:Dark*). Utilizando datos previos del laboratorio<sup>[63]</sup> se extrapola el inicio esperado de la actividad locomotora en condiciones constantes (CT 12; CT, del inglés *circadian time*) respecto al último apagado de la luz.



**Figura 13: Esquemas de iluminación utilizados.** A) LD: 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, B) Jet Lag Crónico experimental, adelantos de 6 hs del encendido de las luces, cada 2 días a partir de LD 12:12. Barras blancas: horarios con la luz encendida, barras grises: horarios con la luz apagada.

### Línea celular para la tumorigénesis

La línea celular tumoral B16-F0 (modelo de melanoma murino; provista por el Laboratorio de Oncología Molecular de la UNQ) se mantuvo en cultivo *in vitro* en medio D-MEM (Gibco), 5% de suero fetal bovino (Bioser) y 1% de glutamina (Gibco), en estufa gaseada a 37°C. El mantenimiento, repiques, congelado/descongelado y recuento celular fueron realizados por integrantes del Laboratorio de Cronobiología, en las instalaciones que disponen dentro de la UNQ. Los animales fueron inoculados con  $3 \times 10^4$  células, de forma subcutánea en el flanco derecho. Los animales inoculados y los controles sanos (inoculados con D-MEM) se mantuvieron en condiciones estándar de bioterio, bajo las condiciones de iluminación correspondientes, y en grupo. El desarrollo tumoral se determinó por palpación, definiendo el tamaño del tumor mediante 3 medidas/semana con calibre Vernier. Para cada animal, el punto final experimental se alcanzó cuando el volumen tumoral llegó a un valor de  $2000 \text{ mm}^3$ , aproximadamente 30-40 días después de la inoculación.

### Muestras biológicas

El sacrificio se realizó en dos puntos horarios bajo condiciones DD: durante el día subjetivo en CT8, y durante la noche subjetiva en CT20. Los animales se anestesiaron mediante la administración, por vía inhalatoria, de una mezcla de isoflurano con oxígeno, utilizando un equipo de anestesia gaseosa. El sacrificio se realizó por dislocación cervical bajo anestesia. Se tomaron muestras de los NSQ, hígado y tumor, colocando los tejidos inmediatamente en TRIzol. El tejido de los NSQ se obtuvo extirpando el

cerebro y congelándolo inmediatamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Se tomó una sección coronal de 1 mm de espesor a la altura del quiasma óptico y se diseccionó la región correspondiente a los NSQ por encima del quiasma óptico, mediante cortes con bisturí bajo lupa. Para las extracciones de tejido hepático y tumoral, los animales se colocaron con el vientre hacia arriba, las extremidades fijas al soporte y se rociaron con etanol 70% para facilitar la disección. Las muestras se almacenaron en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las extracciones de ARN se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Thermo Fisher Scientific), con pequeñas modificaciones. El protocolo utilizado se describe a continuación.

#### *Protocolo de extracción de ARN a partir de 1 ml de TRIzol*

- 1) Tomar el tubo con la muestra en TRIzol; descongelar en un baño con hielo.
- 2) Homogeneizar el tejido en la solución mediante el uso de varillas de teflón. Agitar brevemente con vórtex.
- 3) Incubar 5' a temperatura ambiente.
- 4) Agregar 0,2 ml de cloroformo, agitar por 15'' e incubar 2-3' a temperatura ambiente.
- 5) Centrifugar a 12000g por 15' a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 6) Transferir la fase acuosa a otro tubo.
- 7) Agregar 0,5 ml de isopropanol. Mezclar e incubar 10' a temperatura ambiente (puede realizarse *over night* si hay poco ARN en la muestra).
- 8) Centrifugar a 12000g por 10' a  $4^{\circ}\text{C}$ . Precipita el ARN.
- 9) Remover el sobrenadante.
- 10) Lavar el pellet con 1 ml de etanol 75%. Mezclar.
- 11) Centrifugar a 7500g por 5' a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- 12) Secar a temperatura ambiente por 10-15'.
- 13) Redisolver en 15  $\mu\text{l}$  de agua destilada y congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *Cuantificación*

La concentración y la calidad del ARN extraído se midieron en un Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron alícuotas de trabajo de 500 ng/ $\mu\text{l}$  de ARN.

## Síntesis de ADNc

Para la síntesis del ADNc se utilizó la enzima *Revert Aid Reverse Transcriptase*, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante (Thermo Fisher Scientific):

- 1) Colocar en el siguiente orden: 1 µl de ARN total (500 ng), 1 µl de *random primers* (Invitrogen) (200 ng) y agua libre de *DNAsas/RNAsas* hasta los 13 µl.
- 2) Incubar a 65°C por 5 minutos; luego poner en hielo y centrifugar.
- 3) Colocar en el siguiente orden: 4 µl de buffer, 2 µl de dNTP mix (10 mM cada uno) y 1 µl de transcriptasa reversa, completando un volumen final de 20 µl.
- 4) Incubar a 25°C por 10 minutos, y luego a 42°C por 60 minutos.
- 5) Inactivar la enzima a 70°C por 10 minutos.

## Reacciones de qPCR

Todas las reacciones de qPCR se realizaron utilizando *HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus* (Solis Biodyne), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Cada reacción requirió: 4 µl de mix, *primers* específicos, ADNc y agua libre de *DNAsas/RNAsas*, hasta un volumen final de 20 µl. Las amplificaciones se realizaron por duplicado. Para corroborar el producto de PCR, se corrieron curvas de *melting* en todos los casos. El gen *housekeeping Hprt* (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) se utilizó para relativizar los resultados de los genes de interés.

Los primers utilizados fueron los siguientes:

- Hprt*:      *Forward* 5'- TgT Tgg ATA CAg gCC AgA C -3'  
               *Reverse* 5'- Tgg CAA CAT CAA CAg gAC TC -3'
- Bmal1*:     *Forward* 5'- ggA CCC AAC CTT CCC gCA gC -3'  
               *Reverse* 5'- CTg CTC Cgg CTC Tgg TTC CC -3'
- Per1*:      *Forward* 5'- gTT gTg CAC CCg Tgg Tgg CT -3'  
               *Reverse* 5'- gTT CTC Cgg gCC Tgg ggT CT -3'
- Per2*:      *Forward* 5'- AAg TgA Cgg gCC gAg CAA ggg -3'  
               *Reverse* 5'- Tgg Tgg gAC Tgg Tgg gAC TTg g -3'

*Nat1*: Forward 5'- TCg CCA gCA TCT gTg TTT gTA AgC -3'  
Reverse 5'- Tgg AgC CCA CTA AAC AgT gAA CCC -3'

*Gstt1*: Forward 5'- gCC TCT gCC ATg gTT CTg gAg CTg -3'  
Reverse 5'- ggC AAA CgC ATC gCT gAg gTg -3'

*Cyp1a1*: Forward 5'- AgC ggC ACT CTg gAC AAg Cg -3'  
Reverse 5'- gCT gCA gCA AgA Tgg CCA gg -3'

Se utilizó una concentración de *primers* de 250 nM y 1 ul de ADNc por reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo *MiniOpticon real-time PCR detection system* (Bio-Rad), y el procesamiento de los datos se realizó con *CFX Manager software* (Bio-Rad).

### **Análisis estadístico**

A partir de los valores de Ct (*cycle threshold*) entregados por el software, se calcularon los niveles de expresión relativos de ARNm siguiendo el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ <sup>[85]</sup>. Se utilizó el *software GraphPad Prism* para graficar los resultados y realizar los tests estadísticos necesarios (t test, no paramétricos, ANOVA de dos vías, test de Bonferroni).

## RESULTADOS

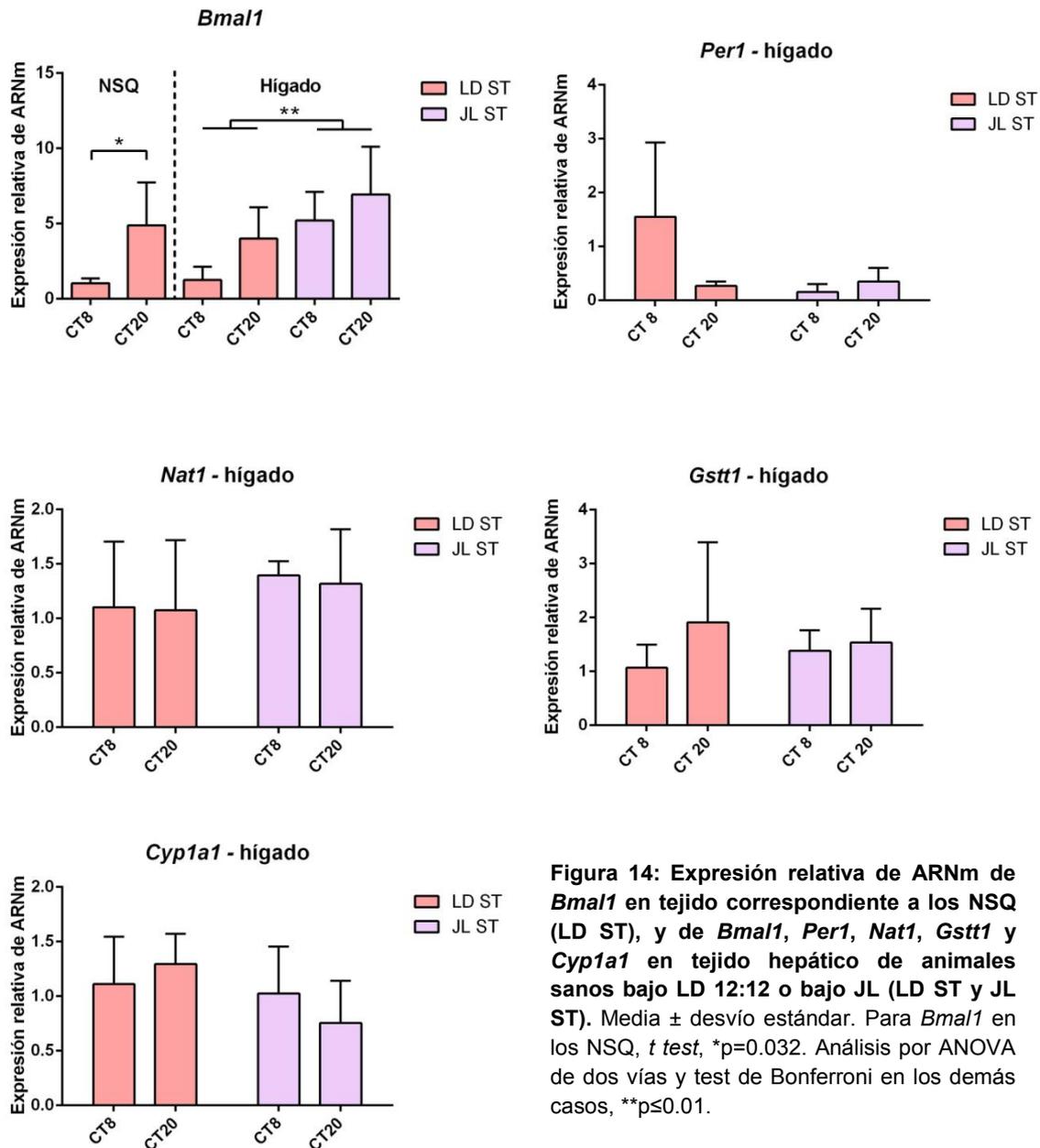
En las siguientes secciones, se describen los resultados obtenidos a partir del modelo animal. En todos los casos, se analiza expresión de ARNm de genes reloj y GMX, utilizando *Hprt* como gen *housekeeping* para relativizar los resultados. Los gráficos representan la media  $\pm$  desvío estándar. Los grupos de animales bajo análisis se identifican de la siguiente manera:

LD: animales bajo protocolo estándar de luz-oscuridad (LD 12:12); JL: animales bajo protocolo de desincronización circadiana por *jet lag* crónico experimental; ST: animales sin tumor, sanos; CT: animales con tumor, desarrollado a partir de células tumorales inoculadas; CT8: *circadian time 8*, punto horario de día; CT20: *circadian time 20*, punto horario de noche.

### Desincronización circadiana en genes reloj y GMX por jet lag crónico

Al evaluar la expresión de ARNm del gen reloj *Bmal1*, en los NSQ, bajo condiciones estándar de luz-oscuridad (LD 12:12), se observó que en los animales sin tumor los niveles en CT20 fueron significativamente mayores respecto de los obtenidos en CT8 ( $p=0.032$ ), lo que se corresponde con el patrón de expresión esperado para este gen<sup>[86]</sup>.

A fin de analizar los efectos del JLC sobre los tejidos periféricos, se procedió a medir la expresión relativa de ARNm en tejido hepático de animales sanos bajo LD y JL. Respecto de *Bmal1*, se observó que la expresión en CT8 y CT20 en los animales LD ST fue significativamente diferente, siendo mayor por la noche ( $p=0.04$  por *t test*, no mostrado en el gráfico). Además, se observó expresión diferencial de este gen como resultado del protocolo de JL (ANOVA de dos vías,  $p=0.006$ ). Para el gen reloj *Per1*, se observó mayor expresión en CT8 frente a CT20 para el grupo LD ST, lo cual se corresponde al patrón esperado, y una disminución de la expresión en ambos puntos horarios para el grupo JL ST, sin significancia estadística. Al analizar los GMX *Gstt1*, *Nat1* y *Cyp1a1*, no se encontraron patrones de expresión claros ni diferencias significativas entre los grupos bajo estudio. Estos resultados se grafican en la Figura 14.



### Alteraciones circadianas inducidas por el tumor

A fin de evaluar el impacto de la presencia del tumor sobre el sistema circadiano a nivel de los NSQ y en tejido hepático, se comparó la expresión de ARNm de los genes de interés entre los grupos LD ST y LD CT (Fig. 15). Respecto de *Bmal1* en los NSQ, no fue posible evidenciar diferencias entre los grupos, aunque se registró mayor expresión en el punto horario de noche (resultado para LD ST descrito en la sección anterior). En tejido hepático, se observó expresión diferencial de *Bmal1* entre los dos puntos horarios, siendo mayor en CT20 (ANOVA de dos vías,  $p=0.021$ ), independientemente de la

presencia o ausencia del tumor. Además, la expresión de *Bmal1* en CT8 fue significativamente diferente de CT20 en el grupo LD ST (test de Bonferroni,  $p < 0.05$ ). Al evaluar la expresión de *Gstt1*, se observó una disminución en los niveles de ARNm en el grupo LD CT, en ambos puntos horarios, no significativa. *Cyp1a1* presentó expresión diferencial según la presencia o ausencia del tumor, siendo menores los niveles de ARNm en el grupo LD CT (ANOVA de dos vías,  $p = 0.007$ ). *Nat1* no mostró diferencias entre los grupos.

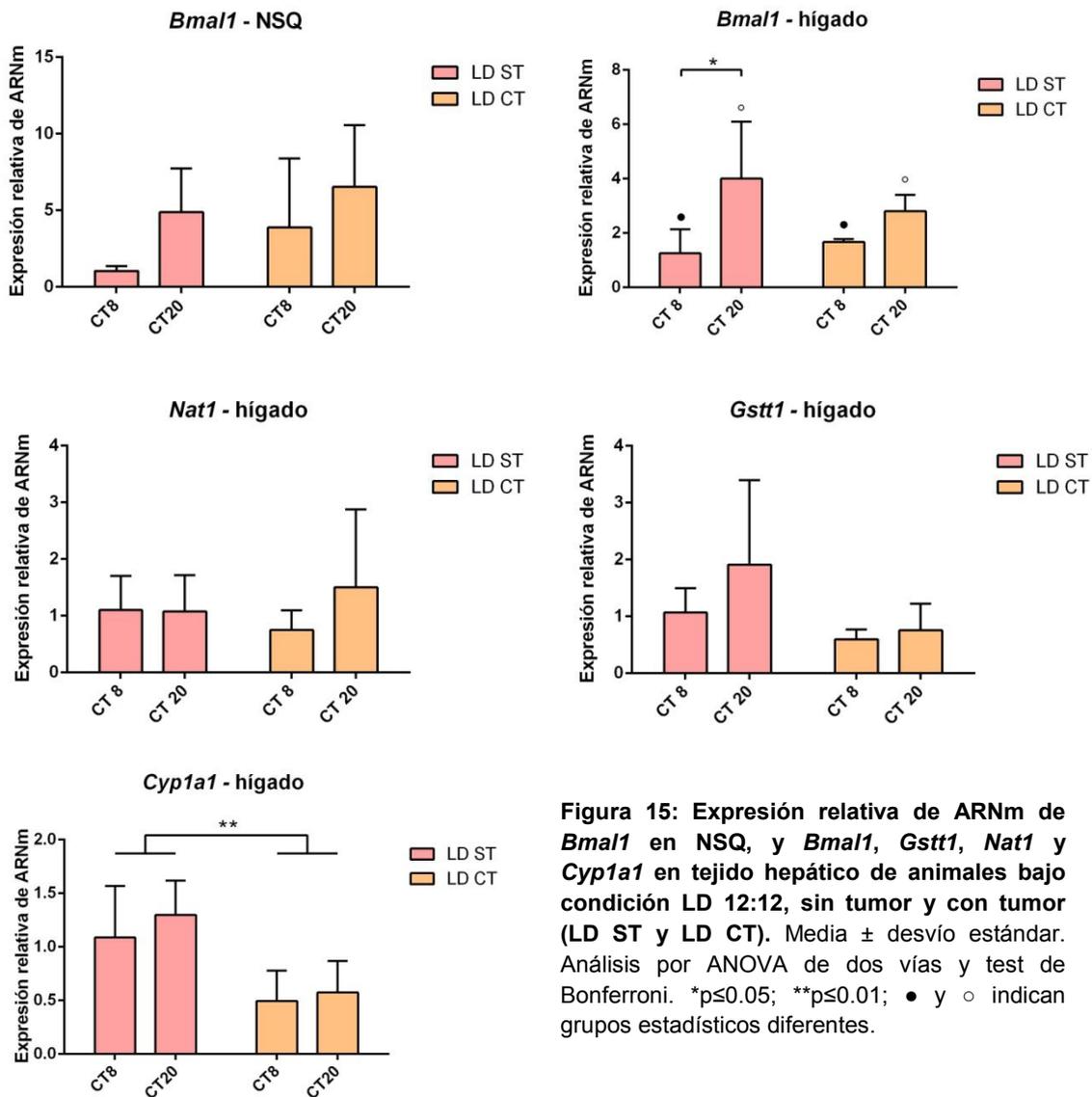
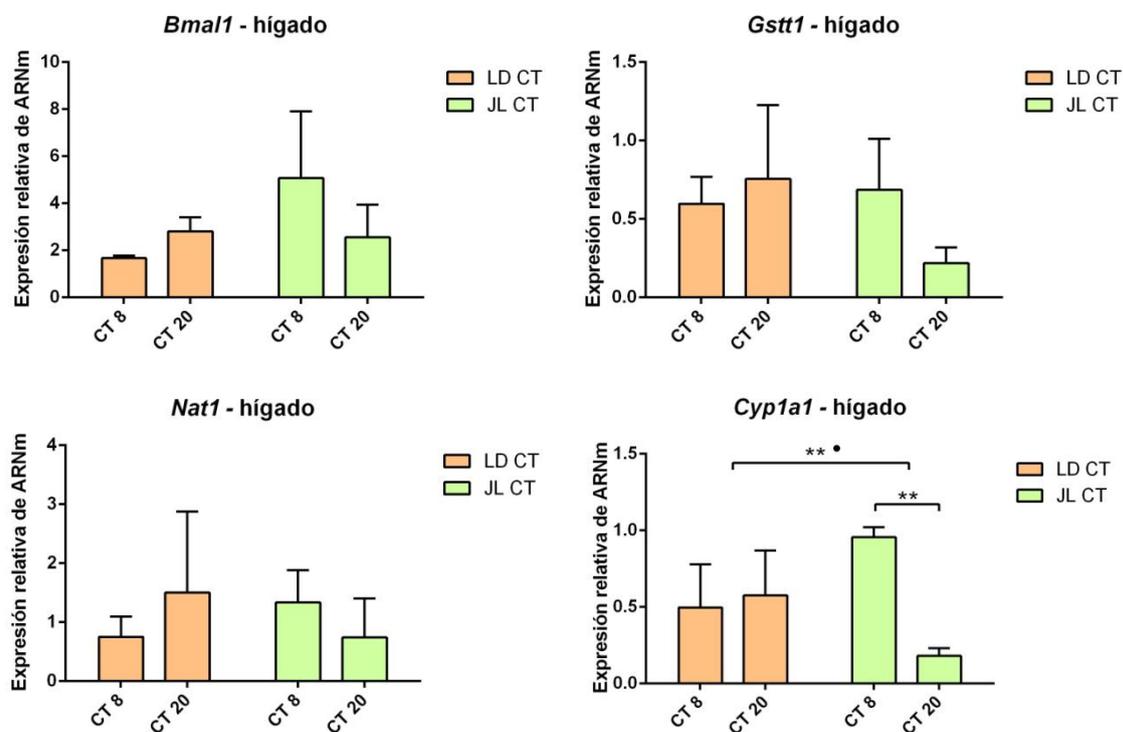


Figura 15: Expresión relativa de ARNm de *Bmal1* en NSQ, y *Bmal1*, *Gstt1*, *Nat1* y *Cyp1a1* en tejido hepático de animales bajo condición LD 12:12, sin tumor y con tumor (LD ST y LD CT). Media  $\pm$  desvío estándar. Análisis por ANOVA de dos vías y test de Bonferroni. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.01$ ; • y ◦ indican grupos estadísticos diferentes.

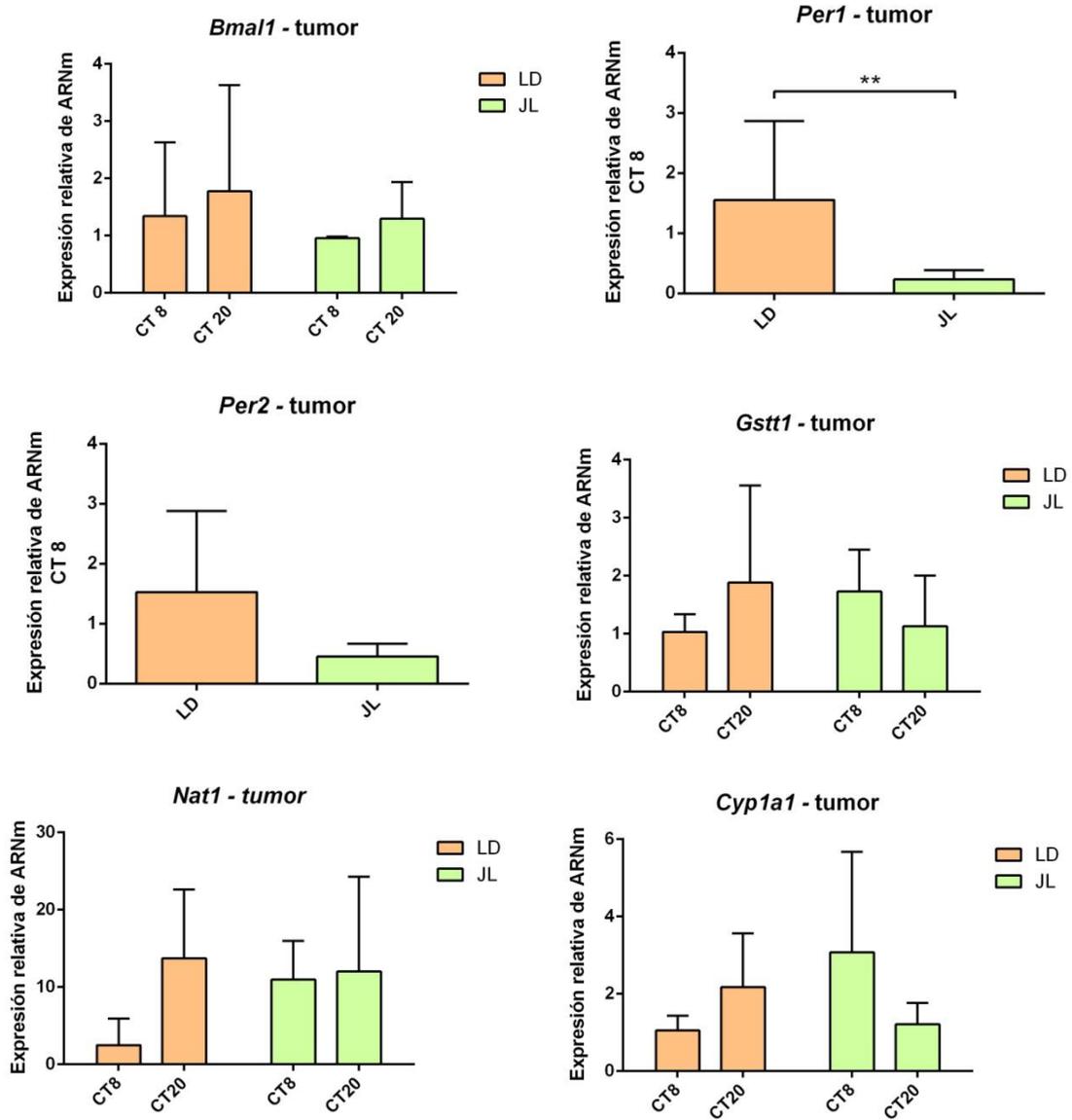
## Desincronización circadiana y desarrollo tumoral

En esta sección se evalúan los niveles de expresión de ARNm de los genes de interés, en tejido hepático (Fig. 16) y tumoral (Fig. 17) de animales inoculados con la línea celular, y mantenidos bajo LD o JL. Para *Bmal1* en hígado, el grupo LD CT presentó un patrón similar al patrón normal esperado, aunque no se evidenciaron diferencias significativas entre los grupos. *Cyp1a1* presentó diferencias significativas en la expresión de ARNm entre los puntos horarios ( $p=0.011$ ), y dentro del grupo JL (CT8 vs. CT20,  $p=0.001$ ), además de interacción significativa entre el factor LD/JL y el punto horario CT8/CT20 ( $p=0.003$ ), mediante ANOVA de dos vías. *Gstt1* y *Nat1* no mostraron diferencias entre los grupos en tejido hepático.

Los análisis de expresión de ARNm en tejido proveniente del tumor no arrojaron diferencias entre los grupos en estudio, excepto para *Per1*, donde los niveles fueron significativamente menores bajo JL en CT8 respecto del mismo punto horario bajo LD (*Mann Whitney test*,  $p<0.01$ ). Para los demás casos, si bien se observaron niveles de expresión más altos/bajos en algunos grupos, los datos presentaron mucha dispersión.



**Figura 16: Expresión relativa de ARNm de *Bmal1*, *Gstt1*, *Nat1* y *Cyp1a1* en tejido hepático de animales con tumores bajo LD y JL. Media  $\pm$  desvío estándar. Análisis por ANOVA de dos vías y test de Bonferroni; • $p<0.05$  entre puntos horarios; \*\* $p\leq 0.01$  para la interacción, y en JL CT8 vs. JL CT20.**



**Figura 17: Expresión relativa de ARNm de *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Gstt1*, *Nat1* y *Cyp1a1* en tejido tumoral de animales bajo condición LD o JL. Media ± desvío estándar. Análisis por ANOVA de dos vías en todos los casos, excepto para *Per1* y *Per2*, donde se aplicó *Mann Whitney test*, \*\* p<0.01. Los resultados obtenidos en CT8 para los genes *Per* provienen de un protocolo en donde sólo se tomaron muestras en un punto horario. Por dificultades técnicas, no fue posible amplificar esos genes en el protocolo con dos puntos horarios.**

## DISCUSIÓN

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar los niveles de expresión de ARNm de genes reloj y GMX, en diversos tejidos provenientes de animales bajo dos esquemas de iluminación distintos (LD y JLC), e inoculados con células tumorales. Para ello se utilizó un modelo murino de desincronización forzada previamente caracterizado, junto a un modelo de tumorigénesis experimental, a fin de analizar cómo el sistema circadiano, el sistema de metabolización de xenobióticos y el desarrollo tumoral funcionan bajo esas condiciones, y si interaccionan entre ellos.

Siguiendo el protocolo descrito, la expresión de ARNm de *Bmal1* a nivel de los NSQ, en animales sanos, fue menor en CT8 (día) y mayor en CT20 (noche). Este patrón se corresponde a lo reportado en la bibliografía para este gen reloj bajo condiciones LD 12:12<sup>[76,86,87]</sup>. Los niveles de expresión descritos para *Bmal1*, en tejido hepático de animales sanos bajo LD, también se corresponden a lo reportado en la bibliografía, y guardan relación con los resultados descritos para los NSQ. También se observó una alteración en el patrón de expresión hepática de *Bmal1* cuando los animales son sometidos a desincronización circadiana por JLC. Yamamoto *et al.*<sup>[88]</sup> realizaron un análisis sistemático de los niveles de expresión de ARNm de genes reloj en numerosos tejidos periféricos, utilizando ratones macho Balb/c. Como resultados, encontraron patrones de expresión circadianos robustos en corazón, pulmón, hígado, estómago, bazo, y riñón. El pico en el nivel de transcritos para *Bmal1* en tejido hepático lo registraron en CT20-CT0, con el mínimo de expresión en CT8-CT12, por lo que nuestros resultados bajo condiciones de LD se encuentran en concordancia con este reporte. Por otra parte, Zhang *et al.*<sup>[78]</sup> evaluaron la expresión de *Bmal1* a nivel de ARNm en tejido hepático de ratones macho C57BL/6 bajo condiciones LD, informando niveles de expresión mínimos entre ZT9-ZT13, y máximos entre ZT21-ZT5 (ZT: *zeitgeber time*). Al igual que en el caso anterior, nuestros resultados están en concordancia con lo descrito por otros grupos de investigación.

Respecto a los niveles de expresión de ARNm de GMX, nuestros resultados no mostraron patrones claros en los dos puntos horarios analizados, ni diferencias significativas entre los grupos LD y JL. Está reportado que los

picos de expresión de ARNm de las enzimas GSTs suelen observarse durante el día<sup>[89,90]</sup>. Sin embargo, para la familia de GSTs theta (Gstt), los niveles máximos de ARNm se encontraron durante la noche<sup>[78]</sup>, por lo que nuestros resultados para *Gstt1* se acercan a lo reportado en la bibliografía. Para las enzimas CYP450 los niveles de máxima acumulación de ARNm se observan durante la noche<sup>[78]</sup>. En general, la expresión circadiana de enzimas metabolizantes en el hígado puede clasificarse en aquellas cuyo pico se encuentra durante el día, y aquellas donde se lo encuentra durante la noche: los genes que exhiben picos en la fase nocturna son en su mayoría los involucrados en la fase I del metabolismo, mientras que la mayoría de las enzimas de fase II y los transportadores tienen sus picos de expresión de ARNm en la fase diurna<sup>[78,91]</sup>. Dado que el hígado constituye el principal sitio de metabolización de drogas y detoxificación, los ritmos circadianos existentes en su maquinaria celular pueden afectar la sensibilidad a los agentes ambientales, las respuestas terapéuticas y su toxicidad<sup>[89]</sup>.

Es posible que los puntos horarios donde se tomaron las muestras hepáticas de nuestro modelo murino, no permitan evidenciar con claridad los niveles mínimos y máximos de expresión de ARNm de los genes estudiados. Cabe recordar que los estudios realizados por distintos grupos de investigación utilizaron modelos con *backgrounds* genéticos diversos y diferentes condiciones experimentales. Debe tenerse en cuenta también, que el funcionamiento del reloj hepático puede verse afectado por varios factores, como la señalización hormonal o los comportamientos alimentarios. Estos últimos no fueron controlados en nuestro protocolo, y podrían explicar -al menos en parte- la falta de patrones de expresión circadianos de los GMX en el hígado.

Varios estudios en modelos animales han aplicado protocolos de JLC similares al descrito en esta tesis, reportando alteraciones en la expresión génica de los genes reloj, tanto a nivel central como en tejidos periféricos<sup>[87,92-94]</sup>. Iwamoto *et al.*<sup>[87]</sup> aplicaron un protocolo de *jet lag* consistente en avances de 8 horas en el ciclo luz-oscuridad, cada dos días, durante 10 días, en ratones macho CBA/N. Tanto los animales control como los que estaban bajo *jet lag*, presentaron variaciones circadianas significativas al evaluar niveles de ARNm de *Bmal1* en tejido hepático. Sin embargo, en estos últimos, el patrón temporal

presentó corrimiento de fase (entre 7 y 11.2 horas de atraso), un resultado que también reportaron para otros genes reloj. Dado que para nuestro protocolo sólo se cuenta con información de dos puntos horarios, no es posible describir con exactitud de qué manera se vio afectado el patrón de expresión circadiano.

En relación a los niveles de ARNm de GMX, evaluados en tejido hepático de animales bajo JL, resulta de especial interés el trabajo de Kettner *et al.*<sup>[95]</sup>, publicado recientemente. Mediante estudios a gran escala, con ratones C56BL/6J (tanto *wild type* como mutantes para los genes reloj) sometidos a protocolos de LD o JLC, los autores concluyeron que el JLC experimental induce la desregulación persistente de la expresión génica y del metabolismo hepáticos, culminando en el desarrollo de carcinoma hepatocelular en estos animales. El metabolismo de xenobióticos, junto al metabolismo de ácidos biliares y colesterol, aparecieron como las principales rutas metabólicas desreguladas, en los hígados de ratones *wild type* bajo JLC. En particular, numerosos representantes de las familias enzimáticas glutatión S-transferasas, citocromos P450, sulfotransferasas, N-acetil transferasas, uridina 5'-trifosfato glucuronosiltransferasas, epóxido hidrolasas, y factores de transcripción tales como DBP, PPAR y CAR, entre otros, mostraron niveles de ARNm alterados en el tejido hepático de estos animales, al compararlos con ratones bajo LD. Los autores también remarcan el rol de CAR, receptor nuclear que se vio activado por la interrupción circadiana experimental, y propuesto como responsable de la progresión hacia el carcinoma hepatocelular. Tal como se describe en la Introducción de esta tesis, los receptores nucleares que detectan xenobióticos (CAR, PPARA y AHR/ARNT) y los factores de transcripción PARbZip constituyen *clock-controlled genes*, y son los encargados de enlazar el sistema circadiano con el de metabolización de xenobióticos. Gachon *et al.*<sup>[96]</sup> reportaron que el *knockout* de estos factores de transcripción genera cambios en la expresión de numerosas enzimas de fase I, II y transportadores. Puede esperarse, por lo tanto, que protocolos de desincronización circadiana alteren los niveles de estos factores de transcripción, con la consiguiente desregulación del metabolismo hepático, tal como se demuestra en el trabajo de Kettner *et al.* citado previamente en este párrafo.

Con el fin de evaluar el impacto del desarrollo tumoral sobre el sistema circadiano, se compararon los niveles de ARNm de los genes de interés en animales sanos y con tumores, bajo condiciones de iluminación estándar (LD). En los NSQ, se observó una mayor expresión de *Bmal1* durante la noche, aunque no fue posible detectar diferencias estadísticamente significativas entre los puntos horarios. Al comparar los niveles de expresión en tejido hepático, encontramos que, respecto al mismo gen, tanto los animales LD ST como los LD CT, presentan el patrón de expresión esperado, con valores significativamente más altos en CT20. Un resultado similar fue reportado por Filipski *et al.*<sup>[93]</sup>, donde tanto *Bmal1*, como *Per2* y *Rev-erba* -medidos a nivel de ARNm en tejido hepático de ratones con osteosarcomas-, mostraron variaciones circadianas similares a las que observaron en los hígados de animales sanos. En un trabajo realizado por You *et al.*<sup>[97]</sup>, se utilizaron ratones hembra C3H inoculadas con células tumorales mamarias con el objetivo de determinar en qué medida el sistema circadiano -bajo condiciones LD- permanece inalterado en estos animales con tumores. El pico de *Bmal1* en tejido hepático se presentó 9 horas luego de apagarse las luces, un resultado similar al obtenido en nuestro protocolo. Teniendo en cuenta los resultados de *Bmal1*, junto a *Per1* y *Per2*, los autores de dicho trabajo concluyeron que los patrones de expresión de genes circadianos en el hígado de animales con tumores fueron muy similares -en amplitud y fase- a los reportados para tejido hepático de animales sanos. A partir de los resultados mencionados, puede inferirse que la presencia del tumor en el organismo no estaría afectando la expresión de los genes reloj en este tejido periférico.

Respecto a los niveles de expresión hepática de los GMX, encontramos una disminución en los niveles de ARNm de *Gstt1* y *Cyp1a1* en el grupo LD CT. Una posible explicación radica en la conexión existente entre las citoquinas derivadas del tumor y la disminución en el metabolismo xenobiótico del hígado (<sup>[98]</sup> y revisado en Morgan *et al.*<sup>[99]</sup>). En lo que respecta a las enzimas de fase I CYP450, se han reportado reducciones significativas en sus niveles de ARNm (*Cyp2b10*, *Cyp27a1*), y también a nivel proteico (*Cyp1a2*, *Cyp2d9*). Al evaluar las enzimas de fase II, se identificaron 6 GSTs con reducción en su expresión y 2 sin modificaciones, mientras que las sulfotransferasas mostraron reducciones (*Sult2a1*) e incrementos (*Sult1a1*) en su expresión. También se reportaron

reducciones en los niveles de expresión de enzimas transportadoras en estados inflamatorios (*Mdr2*, *Mrp3*, y *Oatp2*, del inglés multidrug resistance protein 2, multidrug resistance-associated protein 3 y organic anion transporting polypeptide 2, respectivamente, entre otras). Tal como se mencionó antes, numerosas enzimas metabolizantes están reguladas por los receptores nucleares PXR (pregnane X receptor) y CAR. Al inducir la expresión de las enzimas CYP450 a través de los ligandos específicos de PXR y CAR, se encontró que la respuesta fue reducida en el hígado de los animales con tumores, indicando una alteración en la acción de estos receptores involucrados en el metabolismo y *clearance* de numerosos compuestos<sup>[98]</sup>. Se propuso que las citoquinas pro-inflamatorias (interleuquina 1, interleuquina 6, interferón, TNF -tumor necrosis factor-) modularían la actividad de los factores de transcripción en el hígado, llevando a una disminución en la expresión de las enzimas CYP450, particularmente. Por otro lado, estas citoquinas inflamatorias son capaces de interrumpir o desregular el sistema circadiano, tanto en modelos animales como en pacientes oncológicos<sup>[100]</sup>. Considerando que nuestros resultados no muestran alteraciones en los patrones de expresión de *Bmal1* en el hígado de animales con tumores, la disminución en los niveles de ARNm de *Gstt1* y *Cyp1a1* podría deberse a otras vías de señalización, actuando independientemente de reguladores circadianos.

Estudios tanto en modelos animales como en pacientes oncológicos, sugieren que la organización circadiana puede mantenerse casi sin alteraciones hasta cierto punto, durante los primeros estadios del cáncer, luego del cual el ritmo se vea alterado o anulado a medida que avanza la progresión tumoral<sup>[101]</sup>.

Tal como se indicó antes, los animales que desarrollaron tumores bajo condiciones de LD mostraron el patrón de expresión esperable para *Bmal1* en tejido hepático. Respecto a la expresión de este mismo gen en los animales con tumores bajo JLC, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas entre los dos puntos horarios, ni tampoco diferencias entre este grupo y el grupo en LD. El trabajo de Filipinski *et al.*<sup>[93]</sup> mencionado antes, reportó patrones de expresión de ARNm alterados para *Per2* y *Bmal1* en este tejido debido al JLC, en animales con tumores. Específicamente, *Bmal1* presentó

picos de expresión con un corrimiento de fase de 12 horas respecto de lo observado en animales sincronizados; además no fue posible detectar en estos animales el ritmo sinusoidal observado en los animales sanos. En otro trabajo llevado a cabo por Wu *et al.*<sup>[92]</sup> se reportó que el protocolo de JLC aplicado a animales con carcinomas de pulmón alteró significativamente el patrón de expresión circadiano de *Per2* en el hígado, llevándolo a periodicidades ultradianas.

Respecto a los GMX evaluados, observamos diferencias significativas en la expresión de *Cyp1a1*, entre los puntos horarios y dentro del grupo JL. Dado que en animales sanos no se registraron diferencias en los niveles de expresión de estos genes, tanto bajo LD como bajo JL en los dos puntos horarios analizados, podría sugerirse que el JL afecta de manera diferencial la expresión génica hepática cuando sucede en el contexto del desarrollo tumoral.

Nuestros resultados sobre tejido tumoral indicaron una marcada disminución de la expresión de ARNm de *Per1* y *Per2*, mientras que para *Bmal1* y los GMX no mostraron diferencias significativas entre los dos puntos horarios, ni al comparar el protocolo LD frente al JL. Además, para este tejido, se observó una mayor dispersión de los datos. Cada una de las enzimas del sistema de metabolización presenta niveles de expresión tiempo-específicos, y órgano-, tejido- y tipo celular-específicos<sup>[102]</sup>, lo que dificulta las comparaciones entre estudios. Están reportados en la bibliografía aumentos y disminuciones en los niveles de expresión de GMX en tejido tumoral de pacientes, respecto del tejido adyacente no tumoral. Estas variaciones parecen depender del tipo tumoral en análisis y de la enzima en particular cuyos niveles se miden<sup>[103-105]</sup>.

Varios estudios han reportado variaciones en el nivel de expresión de genes reloj, a lo largo de las 24 horas, en el tejido tumoral de animales bajo LD y JL<sup>[92-94]</sup>. Sin embargo, los patrones de expresión en estos estudios discreparon significativamente entre los dos protocolos de luz-oscuridad, indicando una clara alteración por el JLC, y eliminando en la mayoría de los casos el ritmo circadiano sinusoidal. Dado que en nuestro protocolo se cuenta con información sobre dos puntos horarios opuestos (o uno en el caso de *Per*), no es posible definir si el ritmo en este tejido se encuentra con corrimientos de fase o anulado.

Cabe mencionar que estudios en ratones deficientes de *Per1/2*, *Cry1/2* o con una sola copia de *Bmal1* reportaron incrementos en la tasa espontánea de desarrollo tumoral, así como también en el desarrollo de tumores inducidos por radiación<sup>[106,107]</sup>. Un estudio reciente utilizó un modelo de tumorigénesis inducida por dimetilnitrosamina, en ratones con mutaciones en *Per2*. Los autores reportaron severas alteraciones en la expresión génica o proteica en el tejido hepático, en relación a procesos claves de la carcinogénesis - proliferación incontrolada, inestabilidad genómica e inflamación-, así como también vieron una acelerada carcinogénesis en el hígado de estos animales<sup>[108]</sup>. Estos resultados aportan nuevas evidencias sobre el rol supresor de tumores de los genes *Per*, sumándose a estudios existentes de sobre-expresión o supresión de *Per* en distintos modelos experimentales de cáncer<sup>[109-111]</sup>. La disminución en la expresión diurna de *Per1* y *Per2*, en los tumores bajo el protocolo de JLC aplicado en esta tesis, está en concordancia con la bibliografía existente, pudiendo sugerirse una conexión entre los bajos niveles de *Per*, y el aumento de la tasa de crecimiento tumoral observado en los animales sujetos a JLC, con respecto al esquema LD.

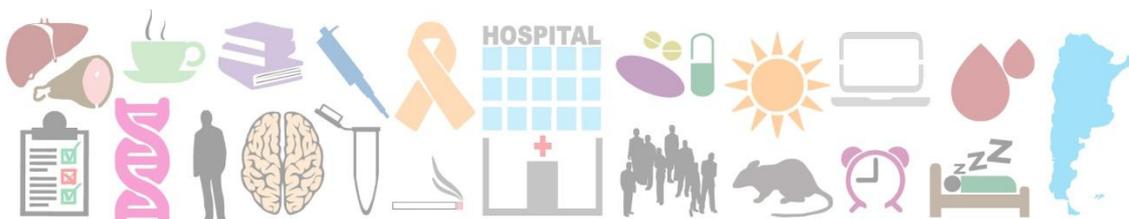
## CONCLUSIONES PARCIALES

Considerando todos los resultados descritos, puede inferirse que: 1) el solo desarrollo de un tumor del tipo experimental utilizado, no es capaz de afectar el patrón de expresión de *Bmal1* en tejido hepático y a nivel central, al menos bajo las condiciones y metodologías aplicadas en este protocolo; sin embargo la expresión de *Bmal1* sí se ve afectada en el hígado cuando los animales con tumores son sometidos a JLC; 2) los niveles diurnos de *Per1* y *Per2* son marcadamente menores en el tejido tumoral bajo JLC, respecto del mismo tejido en condiciones normales de LD, lo que soporta la hipótesis de una función supresora de tumores para estos genes; 3) el desarrollo de un tumor extra-hepático es capaz de afectar la expresión de las enzimas metabolizantes en el hígado, disminuyendo sus niveles de ARNm (cuando estos niveles -ya disminuidos en condiciones de LD- son comparados con los niveles observados bajo JL, se encuentra que este último protocolo disminuye aún más los niveles de ARNm de estas enzimas, al menos en uno de los puntos horarios). Una posible hipótesis para este último punto consiste en que la desincronización circadiana por JLC induciría la desincronización del sistema inmune, potenciando los efectos que éste tiene sobre el tejido hepático al disminuir -mediante citoquinas pro inflamatorias- los niveles de expresión de las enzimas CYP450. Una de las consecuencias radicaría en el aumento de la toxicidad de compuestos endógenos y exógenos, favoreciendo el desarrollo tumoral.

Futuros análisis en este campo deberán ser diseñados con el objetivo de obtener tejido tumoral y su contraparte sana, a intervalos de tiempo suficientes para registrar la existencia -o no- de ritmo en los genes de interés, o las modificaciones que éste sufra, tanto en condiciones estándar de luz-oscuridad, como bajo protocolos de desincronización.

## PARTE II

### ASOCIACIÓN ENTRE LAS ENFERMEDADES ONCO- HEMATOLÓGICAS Y LOS POLIMORFISMOS DE GENES RELOJ Y GMX, FUNCIONALIDAD DEL PACIENTE, HÁBITOS DIETARIOS, Y TABAQUISMO



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño de estudio caso-control

#### *Aspectos bioéticos*

Conforme a la reglamentación vigente, el plan de trabajo correspondiente a esta tesis fue presentado al Comité de Ética del IMBICE y al Comité de Ética y de Investigación del Hospital Zonal General de Agudos San Roque (Gonnet, La Plata), durante 2012 y 2013. Una vez obtenidas las aprobaciones, se informó a CONICET y al Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. Rossi, a fin de iniciar la toma de muestras. La hoja de información para el participante y el formulario de consentimiento informado se encuentran en el anexo, así como las correspondientes aprobaciones de los comités.

#### *Reclutamiento*

De junio de 2013 a marzo de 2015, se reclutaron 499 participantes concurrentes a la Unidad de Diagnóstico, Tratamiento y Sostén de Enfermedades Hematológicas del Hospital Interzonal General de Agudos Prof. Dr. Rodolfo Rossi, de la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina). Del total, 64 pacientes se excluyeron del estudio por presentar historia previa de cáncer (en próstata, riñón, vejiga, melanoma, mama, útero, tiroides, cabeza y colon), o patologías relacionadas al cáncer hematológico (aplasia medular, gammapatía monoclonal benigna, leucocitosis, trombocitemia, policitemia vera, enfermedad de Castleman), siendo los 435 pacientes restantes parte del diseño caso-control.

Los casos (n=125) son pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA, n=10), leucemia mieloblástica aguda (LMA, n=18), leucemia linfoblástica crónica (LLC, n=10), leucemia mieloblástica crónica (LMC, n=20), mieloma múltiple (MM, n=29), linfoma de Hodgkin (LH, n=18) o linfoma no-Hodgkin (LNH, n=20). Los controles (n=310) incluyen pacientes que visitan con frecuencia la Unidad por controles de rutina de patologías no relacionadas al cáncer, o pacientes que requieren análisis pre-quirúrgicos o de control (por ejemplo, por intervenciones oftalmológicas, exámenes pre-ocupacionales, anemia, entre otros motivos). Todos los participantes residen en

Argentina. Cada paciente fue invitado a participar del estudio y firmó el consentimiento informado.

### *Encuestas*

Al momento de la toma de la muestra, se le realizó un cuestionario a cada participante, con el objetivo de obtener datos socio-demográficos e información sobre hábitos de vida, funcionalidad del paciente e historia de la enfermedad. Respecto a los hábitos del participante, se indagó sobre tabaquismo (categorías fumador/ex-fumador/nunca, duración del hábito en años, cantidad de cigarrillos por día y fecha en la que se dejó de fumar), consumo de alcohol (veces/semana) y de café (tazas/día), e ingesta de alimentos enlatados (veces/semana) y carnes asadas (veces/mes). Para los casos, las categorías “fumador/ex-fumador/nunca” fueron asignadas según el consumo de tabaco al momento del diagnóstico. Respecto a la funcionalidad del participante, se le consultó acerca de cambios en el peso, en el apetito y en el humor, cansancio físico o mental, cansancio al despertar, calidad del sueño, problemas para conciliar el sueño, despertarse varias veces durante la noche, despertarse muy temprano en la madrugada y roncar; el período sobre el que se preguntó se limitó a los 2 meses previos al momento de la encuesta. Una versión completa del cuestionario se encuentra en el anexo.

Todas las entrevistas fueron realizadas por la becaria, así como también la explicación de los objetivos y metodología del presente estudio, y la toma del consentimiento informado.

### **Muestras biológicas**

El personal técnico de la Unidad tomó una muestra de sangre entera por participante, usando para ello punción venosa y depositando la muestra en tubos Vacutainer con EDTA. El volumen obtenido fue variable entre los participantes, atendiendo a su edad, condición de salud, etc.

Cada muestra con su correspondiente encuesta fue codificada con un número de tres dígitos, comenzando por el 001.

Las extracciones de ADN se realizaron de acuerdo al siguiente protocolo:

### *Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre entera*

- 1) En un tubo tipo Eppendorf de 2 ml, colocar 100 ul de sangre entera, 300 ul de buffer de digestión (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, 1% SDS y 50 mM EDTA) y 2,5 ul de proteinasa K (150 ug/ml concentración final). Incubar durante dos horas a 50-55 °C, y luego *over night* a 37 °C.
- 2) Agregar 300 ul de CILi 5M, y mezclar por inversión durante un minuto.
- 3) Agregar 600 ul de SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1), y colocar los tubos en agitador durante 30 minutos.
- 4) Centrifugar los tubos a 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se transfiere a otro tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml.
- 5) Agregar dos volúmenes de isopropanol, agitando luego por inversión. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm por 15 minutos.
- 6) Descartar el alcohol, conservando el pellet. Colocar dos volúmenes de etanol absoluto y volver a centrifugar; luego realizar lo mismo con etanol 70%.
- 7) Descartado el etanol 70%, tapan el tubo con parafilm perforado y dejar secar el pellet.
- 8) Resuspender el ADN en 15-30 ul de Tris-Edta o agua milliQ. Colocar en heladera y luego congelar a -20 °C.

### *Cuantificación*

La concentración y la calidad del ADN extraído se midieron en un Nanodrop 2000. Se realizaron alícuotas de trabajo de 10 ng/ul de ADN.

## **Genotipado por PCR y PCR-RFLP**

### *Genotipado de PER3*

El gen reloj *PER3* presenta un polimorfismo de longitud (*VNTR*, *variable number tandem repeats*), que consiste en 4 o 5 copias de una secuencia repetida de 54 pares de bases, ubicada en el exón 18 (número de acceso *GenBank* AB047536). Como resultado, se obtiene una proteína con un *InDel* (inserción/delección) de 18 aminoácidos.

La detección de las variantes alélicas se realizó mediante amplificación genómica por PCR y posterior corrida electroforética, siguiendo el protocolo de Zhu *et al.*<sup>[66]</sup>, con modificaciones realizadas por nuestro laboratorio.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes, en un volumen final de 15 µl: buffer 1X para la enzima *Taq Polymerase Recombinant* (Invitrogen), 20 ng de ADN, 0.25 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.45 U de *Taq Polymerase Recombinant* (Invitrogen).

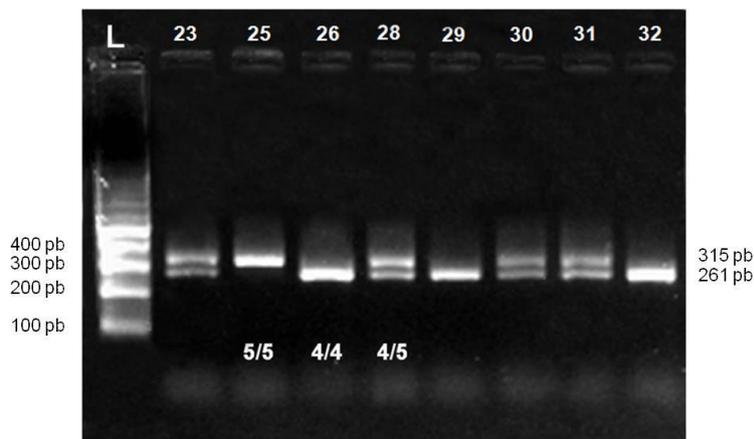
Los *primers* utilizados fueron:

*Forward*: 5'- Tgg CAg TgA gAg CAg TCC T -3'

*Reverse*: 5'- CCA CTA CCT gAT gCT gCT gAA CC -3'

El ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, *annealing* a 58°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 minutos.

Los resultados se visualizaron mediante la siembra de 7 µl de PCR en geles de agarosa 2% teñidos con *Gel Red* (Biotium). El alelo de 4 repeticiones se muestra con una banda de 261 pares de bases, mientras que el alelo de 5 repeticiones con una de 315 pares de bases. Los individuos heterocigotas 4/5 presentan ambas bandas (Fig. 18).



**Figura 18: Visualización de los productos de amplificación por PCR del polimorfismo VNTR del gen *PER3*, mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con *Gel Red*. La banda de 261 pb corresponde al alelo de 4 repeticiones, mientras que la banda de 315 pb corresponde al de 5 repeticiones. La muestra 25 es homocigota para el alelo 5, la 26 es homocigota para el alelo 4, y la 28 es heterocigota para este polimorfismo de longitud. L: *ladder* de 100 pb; 23-32: muestras.**

### Genotipado de *GSTT1/GSTM1*

Los genotipos para *GSTT1* y *GSTM1* (deleciones) se determinaron mediante PCR multiplex, siguiendo el protocolo de Cotignola *et al.*<sup>[112]</sup>, con modificaciones. Las condiciones de reacción fueron las siguientes, en un volumen final de 15 µl: buffer 1X para la enzima *Taq Polymerase Recombinant* (Invitrogen), 30 ng de ADN, 0.50 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5% DMSO y 0.45 U de *Taq Polymerase Recombinant* (Invitrogen).

Los *primers* utilizados para *GSTT1* fueron:

*Forward*: 5' - TTC CTT ACT ggT CCT CAC ATC TC-3'

*Reverse*: 5'- TCA CCg gAT CAT ggC CAg CA -3'

Los *primers* utilizados para *GSTM1* fueron:

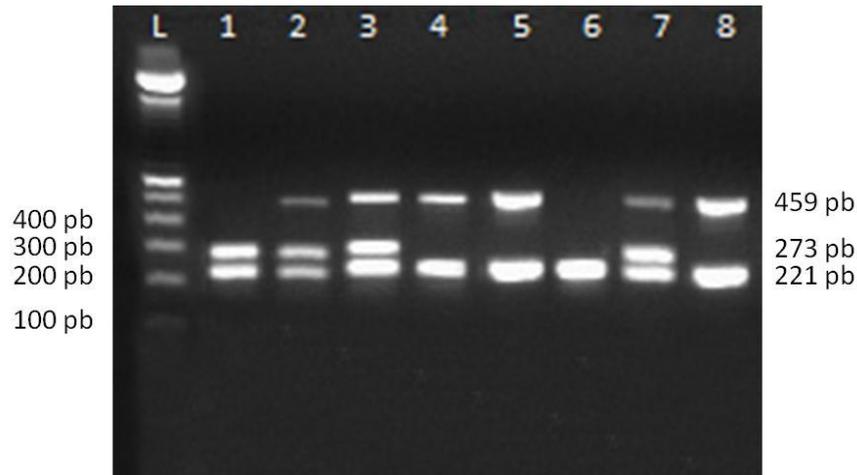
*Forward*: 5' - CTg CCC TAC TTg ATT gAT ggg-3'

*Reverse*: 5'- CTg gAT TgT AgC AgA TCA TgC-3'

El ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 58°C por 30 segundos y elongación a 68°C por 1 minuto, con una extensión final a 68°C por 5 minutos. Los resultados se visualizaron mediante geles de agarosa 2% teñidos con *Gel Red*; la banda de 459 pb corresponde al amplificado de *GSTT1*, mientras que la de 273 pb corresponde a *GSTM1*. La ausencia de banda indica la presencia de la deleción, discriminando el alelo nulo del heterocigota y el homocigota para la presencia del gen.

Para confirmar la presencia de deleción en ambos genes (en aquellas muestras que no amplificaron *GSTT1* ni *GSTM1*, con la consecuente ausencia total de banda), se procedió con un nuevo análisis mediante PCR multiplex, utilizando los *primers* ya descritos para *GSTT1* y *GSTM1*, y los *primers forward*: 5' - TCC AgC AgT TTC ATg AgA TgC - 3' y *reverse*: 5' - gAg gTC ATT TCA TAg CTg AgC - 3' para el gen *CLOCK*, como control interno. Las condiciones de reacción fueron las siguientes, en un volumen final de 15 µl: buffer 1X para la enzima *Taq Platinum Polymerase* (Invitrogen), 50 ng de ADN, 0.25 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0.45 U de *Taq Platinum Polymerase* (Invitrogen). El ciclado consistió en una

desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, *annealing* a 59°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 1 minuto, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. La visualización de los resultados se realizó en geles de agarosa 2% teñidos con *Gel Red* (Fig. 19). El amplificado correspondiente al gen *CLOCK* se observa como una banda de 221 pb.



**Figura 19: Visualización de los productos de amplificación por PCR multiplex de *GSTT1*, *GSTM1* y *CLOCK*, mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con *Gel Red*.** La banda de 459 pb corresponde a *GSTT1*, la banda de 273 pb corresponde a *GSTM1*, y la de 221 pb a *CLOCK*, usado como control de reacción. La muestra 6 presenta doble delección. L: *ladder* de 100 pb.

#### Genotipado de *CYP1A1\*2A*

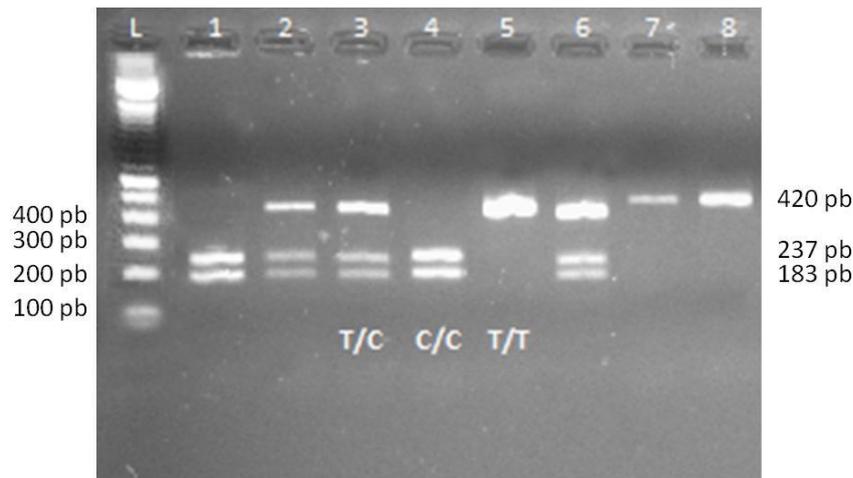
El polimorfismo *MspI* de *CYP1A1* (número de acceso *GenBank* rs4646903) se detectó mediante PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Un producto de 420 pb se amplificó por PCR en un volumen final de 15 ul, conteniendo buffer 1X, 2 mM  $MgCl_2$ , 250 nM de cada *primer*, 200 uM dNTPs, 0,4 U de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen), 30 ng de ADN y  $H_2O$  hasta completar 15 ul. Los *primers* utilizados fueron:

*Forward*: 5' - ACC CCA TTC TgT gTT ggg TT - 3'

*Reverse*: 5' - TAg AgA ggg CgT AAg TCA gCA - 3'

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, *annealing* a 58°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 40 segundos, con una extensión final a 72°C por 5 minutos. Luego de chequear la

amplificación en gel de agarosa 2% teñido con *Gel Red*, 7 ul de producto de PCR se digirieron con 5 U de enzima *MspI* (Thermo Fisher Scientific), buffer y H<sub>2</sub>O hasta completar 15 ul. La incubación fue de 5 horas a 37°C. La verificación de los productos digeridos se realizó en gel de agarosa 2% teñido con *Gel Red*. La variante C posee el sitio de restricción, generando productos de 237 pb y 183 pb (Fig. 20).



**Figura 20: Visualización de los productos de PCR-RFLP para *CYP1A1*, utilizando la enzima *MspI*, mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con *Gel Red*.** La banda de 420 pb corresponde al alelo T, mientras que las bandas de 237 pb y 183 pb definen el alelo C. Las muestras 3, 4 y 5 representan los genotipos posibles. L: *ladder* de 100 pb.

### Análisis estadístico

Los datos recolectados con el cuestionario fueron codificados y volcados a una planilla de Excel, representando cada fila a un participante distinto, y cada columna a una variable del cuestionario. Luego se agregaron columnas para los genotipos evaluados.

Los análisis de asociación se realizaron calculando los *odds ratio* (OR) con un intervalo de confianza del 95%, aplicando el test de Chi<sup>2</sup> para obtener la significancia estadística de dicha asociación. Se realizaron ajustes por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia. Los análisis se realizaron con los *softwares* STATA 11.1<sup>[113]</sup> y Epidat 4.0<sup>[114]</sup>. Las frecuencias alélicas y genotípicas se calcularon y testearon para el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el *software* GenAEx 6.5<sup>[115]</sup>. Los valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. En el diseño caso-control, el tamaño muestral  $n=435$  alcanza una potencia del 80% para detectar un  $OR=2$ .

## RESULTADOS

### Resultados generales respecto de la población en estudio

Las características demográficas de la población en estudio se encuentran detalladas en la Tabla 1. Los datos faltantes de cada variable no se incluyeron en los análisis ni están detallados en las tablas. El número máximo de datos faltantes en una variable fue 18, representando el 4.14% de las muestras. Los datos recolectados para las variables peso y estatura se excluyeron del estudio por contener más del 10% de información faltante.

No hubo diferencias significativas en la edad media de casos y controles, siendo 48.5 años en los casos y 51 años en los controles.

En general, las mujeres mostraron un menor riesgo de enfermedad respecto a los hombres (OR=0.52, IC95% 0.34–0.82,  $p=0.003$ ).

Niveles educativos altos (>12 años de escolaridad) se asociaron significativamente a un incremento en el riesgo de enfermedad, respecto a quienes informaron “primaria completa” o menos (OR=3.68, IC95% 1.82–7.40,  $p<0.001$  ajustado por edad y sexo).

El estado civil no mostró relación con la enfermedad, aunque la categoría “en pareja/casado” presentó valores cercanos a la significancia estadística (OR=1.7, IC95% 0.99-2.95,  $p=0.005$ ).

### Análisis de asociación entre el polimorfismo de *PER3*, variables de funcionalidad y las enfermedades onco-hematológicas

#### *Polimorfismo VNTR de PER3 y enfermedades onco-hematológicas*

La Tabla 2 muestra las frecuencias alélicas y genotípicas del VNTR de *PER3*, y los resultados del análisis de asociación, tanto para las EOH en su conjunto, como para el sub-grupo de leucemias. El alelo de 4 repeticiones presentó frecuencias de 0.69 y 0.76 en casos y controles, respectivamente, mientras que para el alelo de 5 repeticiones, las frecuencias fueron de 0.31 y 0.24 en casos y controles, respectivamente. Las frecuencias alélicas y genotípicas del VNTR de *PER3* se ajustan al Equilibrio de Hardy-Weinberg. Considerando el genotipo 4/4 como referencia, los genotipos 4/5 y 5/5 no mostraron asociación con el riesgo de cáncer hematológico (OR=1.50, IC95%

0.95–2.35 para el heterocigota 4/5 y OR=1.80, IC95% 0.84–3.95 para el homocigota 5/5). El valor p de tendencia fue 0.039.

Al analizar los genotipos 4/5 y 5/5 conjuntamente, se observó un OR=1.39, sin significancia estadística ( $p=0.175$  ajustado por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia). Sin embargo, dichos genotipos mostraron asociación con un aumento del doble en el riesgo de leucemia (LLA, LMA, LLC y LMC en conjunto; OR=1.99, IC95% 1.06–3.74,  $p=0.032$  ajustado por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia). No se encontraron asociaciones significativas entre el polimorfismo y las demás patologías (MM, LH y LHN, datos no mostrados).

#### *Funcionalidad y enfermedades onco-hematológicas*

Respecto a las variables de funcionalidad de los pacientes, evaluadas en el cuestionario, solo “cambios en el humor” mostró una asociación significativa con las EOH en estudio (“cambios positivos” mostró un OR=4.28, IC95% 2.00–9.12,  $p<0.001$ , mientras que “cambios negativos” se asoció con un OR=2.00, IC95% 1.17–3.42,  $p<0.001$ ). Los resultados se encuentran descriptos en la Tabla 3.

#### *Interacción entre genotipos de PER3 y funcionalidad*

La Tabla 4 muestra la distribución de los genotipos de *PER3* en casos y controles, para cada variable de funcionalidad analizada. “Fatiga al despertar” y “roncar” mostraron asociación significativa con los casos portadores de los genotipos 4/5 y 5/5 ( $p=0.003$  y  $p=0.036$ , respectivamente, ajustado por edad y sexo). El resto de las variables incluidas en la encuesta no mostraron asociaciones estadísticamente significativas.

### **Análisis de asociación entre tabaco, hábitos dietarios, polimorfismos de GMX y las enfermedades onco-hematológicas**

#### *Tabaco, hábitos dietarios y enfermedades onco-hematológicas*

Respecto al tabaco, ninguna de las categorías evaluadas mostró asociación con las EOH. Al evaluar los hábitos dietarios, el consumo de carne asada/a la parrilla 3 o más veces/mes mostró una asociación significativa con

un aumento en el riesgo de enfermedad (OR=1.72, IC95% 1.08-2.75, p=0.02). El consumo diario de café también se asoció a un aumento en el riesgo (OR=1.77, IC95% 1.03-3.03, p=0.03). Dado que los participantes control con alguna alteración o problema gastrointestinal podrían estar modificando el OR (ya que en general se abstienen de tomar café), los pacientes derivados por la Unidad de Gastroenterología del hospital fueron removidos del análisis, así como también aquellos que informaron estar bajo tratamiento con protectores gástricos o medicación prescrita por otros problemas gastrointestinales. Con estas consideraciones, se excluyeron 19 participantes; sin embargo, el consumo de café mantuvo su asociación con las EOH, mostrando los mismos resultados (OR=1.01-3.02, p=0.046). Con respecto a los alimentos enlatados y el alcohol, no se encontraron asociaciones significativas entre estos factores y el cáncer hematológico. Al evaluar el riesgo asociado al consumo de café y carne asada/a la parrilla dentro de cada patología, los resultados no mostraron diferencias entre los grupos respecto del consumo de café, pero las patologías LMC y MM se asociaron significativamente al consumo de carne asada/a la parrilla 3 o más veces/mes (ajustado por edad, sexo y nivel educativo; datos no mostrados). Los resultados de esta sección se describen en la Tabla 6.

#### *Polimorfismos en GMX y enfermedades onco-hematológicas*

En cuanto a los polimorfismos de *GSTT1*, *GSTM1* y *CYP1A1* evaluados, los resultados no mostraron asociaciones significativas con el cáncer hematológico. Las frecuencias alélicas para *CYP1A1\*2A* fueron 0.7 y 0.65 en el alelo T para casos y controles, respectivamente, y 0.3 y 0.35 en el alelo C, para casos y controles respectivamente. Respecto de la delección de *GSTT1*, la frecuencia fue de 0.18 para casos y controles, mientras que *GSTM1* mostró frecuencias de 0.5 y 0.47 en casos y controles, respectivamente.

El polimorfismo *MspI* de *CYP1A1* no se encontró en equilibrio de Hardy-Weinberg. Las frecuencias alélicas y genotípicas se detallan en la Tabla 5. Los resultados del análisis de asociación entre los polimorfismos evaluados y las EOH se describen en la Tabla 6.

*Interacción entre GMX, tabaco y hábitos dietarios*

Al analizar la interacción entre los polimorfismos en los GMX y el consumo de tabaco o los factores dietarios, no se encontraron asociaciones significativas que modifiquen el riesgo de enfermedad (datos no mostrados).

**Tabla 1: Características demográficas de la población en estudio**

	Casos <i>N</i> = 125	Controles <i>N</i> = 310	OR (IC95%)	<i>p</i>
	Media (DS)	Media (DS)		
<b>Edad (años)</b>	48.5 (16.6)	51 (18.5)	-	0.507
	<i>N</i> (%)	<i>N</i> (%)		
<b>Sexo</b>				
Masculino	74 (59.2)	134 (43.2)	Ref.	
Femenino	51 (40.8)	176 (56.8)	<b>0.52 (0.34–0.82)</b>	<b>0.003</b>
<b>Nivel educativo</b>				
Primaria completa o menos (≤7 años)	55 (44.0)	174 (56.3)	Ref.	
Secundaria completa (12 años)	48 (38.4)	115 (37.2)	1.2 (0.73–1.95)	
Terc./Univ. completo (>12 años)	22 (17.6)	20 (6.5)	<b>3.68 (1.82–7.40)</b>	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>
<b>Estado civil</b>				
Soltero	27 (21.6)	79 (25.5)	Ref.	
En pareja/casado	86 (68.8)	162 (52.3)	1.7 (0.99–2.95)	0.055 <sup>a</sup>
Divorciado/separado	5 (4.0)	27 (8.7)	0.64 (0.21–1.90)	0.420 <sup>a</sup>
Viudo	7 (5.6)	42 (13.5)	0.75 (0.27–2.13)	0.595 <sup>a</sup>

Terc./Univ.: Terciario/Universitario. a: Ajustado por edad y sexo. OR (IC95%): *odds ratio* e intervalo de confianza 95%. Ref: categoría de referencia. DS: desviación standard. *p* < 0.05 considerado estadísticamente significativo.

**Tabla 2: Asociación entre el polimorfismo de *PER3* y las enfermedades oncohematológicas. También se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas para el VNTR.**

<b>Polimorfismo <i>PER3</i></b>	Casos	Controles	OR (IC95%)	<i>p</i>	Chi <sup>2</sup> & <i>p trend</i>
	<i>N</i> = 120	<i>N</i> = 297			
	<i>N</i> (%)	<i>N</i> (%)			
<b>Frecuencias alélicas</b>					
4-rep	0.69	0.76	-	-	-
5-rep	0.31	0.24			
<b>Frecuencias genotípicas</b>					
4/4	58 (48.3)	176 (59.3)	Ref.		4.26 <b><i>p trend</i> = 0.039</b>
4/5	50 (41.7)	101 (34.0)	1.50 (0.95–2.35)	0.077	
5/5	12 (10.0)	20 (6.7)	1.82 (0.84–3.95)	0.130	
4/4	58 (48.3)	176 (59.3)	Ref.		
4/5 + 5/5	62 (51.7)	121 (40.7)	1.39 (0.86–2.25)	0.175 <sup>a</sup>	-
<b>LMC/LLC/LMA/LLA (<i>N</i> = 58)</b>					
4/4	23 (39.7)	176 (59.3)	Ref.		
4/5 + 5/5	35 (60.3)	121 (40.7)	<b>1.99 (1.06–3.74)</b>	<b>0.032<sup>a</sup></b>	-

a: Ajustado por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia. OR (IC95%): *odds ratio* e intervalo de confianza 95%. Ref: categoría de referencia. *p* < 0.05 considerado estadísticamente significativo.

**Tabla 3: Asociación entre las variables de funcionalidad y las enfermedades onco-hematológicas.**

	Casos N = 125    Controles N = 310		OR (IC95%)	p
	N (%)	N (%)		
<b>Cambios en el peso</b>				
Ninguno	50 (42.0)	140 (47.0)	Ref.	
Aumento/disminución <5kg	31 (26.0)	84 (28.2)	1.03 (0.61–1.74)	0.902
Aumento/disminución >=5kg	38 (32.0)	74 (24.8)	1.43 (0.86–2.38)	0.161
<b>Cambios en el apetito</b>				
Ninguno	72 (60.0)	188 (62.1)	Ref.	
Aumento del apetito	20 (16.7)	58 (19.1)	0.9 (0.50–1.60)	0.721
Disminución del apetito	28 (23.3)	57 (18.8)	1.28 (0.75–2.17)	0.355
<b>Cambios en el humor</b>				
Ninguno	50 (41.0)	163 (53.8)	Ref.	
Cambios positivos	22 (18.0)	24 (7.9)	<b>4.28 (2.00–9.12)</b>	<b>&lt;0.001<sup>a</sup></b>
Cambios negativos	50 (41.0)	116 (38.3)	<b>2.00 (1.17–3.42)</b>	<b>0.001<sup>a</sup></b>
<b>Fatiga física/mental</b>				
No	60 (48.0)	128 (41.4)	Ref.	
Si	65 (52.0)	181 (58.6)	0.77 (0.49–1.19)	0.211
<b>Cansancio al despertar</b>				
No	77 (62.1)	199 (64.6)	Ref.	
Si	47 (37.9)	109 (35.4)	1.11 (0.71–1.75)	0.623
<b>Dificultad para conciliar el sueño</b>				
No	67 (53.6)	175 (56.8)	Ref.	
Si	58 (46.4)	133 (43.2)	1.14 (0.73–1.77)	0.541
<b>Despertar varias veces por la noche</b>				
No	44 (35.2)	122 (39.3)	Ref.	
Si	81 (64.8)	188 (60.7)	1.19 (0.76–1.89)	0.420
<b>Despertar muy temprano</b>				
No	95 (99.0)	207 (96.7)	Ref.	
Si	1 (1.0)	7 (3.3)	0.31 (0.01–2.49)	0.252
<b>Roncar</b>				
No	44 (36.4)	100 (34.8)	Ref.	
Si	77 (63.6)	187 (65.2)	0.94 (0.59–1.50)	0.769
<b>Buena calidad de sueño</b>				
Si	66 (54.1)	159 (51.3)	Ref.	
No	56 (45.9)	151 (48.7)	0.89 (0.57–1.39)	0.599

a: Ajustado por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia. OR (IC95%): *odds ratio* e intervalo de confianza 95%. Ref: categoría de referencia.  $p < 0.05$  considerado estadísticamente significativo.

**Tabla 4: Distribución de genotipos de *PER3* entre casos y controles, y su asociación con las variables de funcionalidad.**

	Casos		Controles		$p^{a,b}$
	4/4	4/5 + 5/5	4/4	4/5 + 5/5	
<b>Cambios en el peso</b>					
Ninguno	22 (40.7)	27 (45.0)	69 (40.8)	62 (53.5)	0.318
Aumento/disminución <5kg	12 (22.2)	18 (30.0)	53 (31.4)	28 (24.1)	
Aumento/disminución ≥5kg	20 (37.1)	15 (25.0)	47 (27.8)	26 (22.4)	
<b>Cambios en el apetito</b>					
Ninguno	32 (57.2)	35 (59.3)	101 (58.7)	80 (67.8)	0.180
Aumento del apetito	12 (21.4)	8 (13.6)	36 (20.9)	19 (16.1)	
Disminución del apetito	12 (21.4)	16 (27.1)	35 (20.4)	19 (16.1)	
<b>Cambios en el humor</b>					
Ninguno	21 (37.5)	26 (42.6)	87 (50.9)	69 (58.0)	0.561
Cambios positivos	12 (21.4)	10 (16.4)	16 (9.4)	8 (6.7)	
Cambios negativos	23 (41.1)	25 (41.0)	68 (39.7)	42 (35.3)	
<b>Fatiga física/mental</b>					
No	29 (50.0)	27 (43.6)	69 (39.4)	54 (44.6)	0.159
Si	29 (50.0)	35 (56.4)	106 (60.6)	67 (55.4)	
<b>Cansancio al despertar</b>					
No	42 (72.4)	31 (50.8)	108 (61.7)	83 (69.2)	<b>0.003</b>
Si	16 (27.6)	30 (49.2)	67 (38.3)	37 (30.8)	
<b>Dificultad para conciliar el sueño</b>					
No	31 (53.4)	31 (50.0)	94 (53.7)	75 (62.5)	0.168
Si	27 (46.6)	31 (50.0)	81 (46.3)	45 (37.5)	
<b>Despertar varias veces por la noche</b>					
No	21 (36.2)	21 (33.9)	66 (37.5)	53 (43.8)	0.335
Si	37 (63.8)	41 (66.1)	110 (62.5)	68 (56.2)	
<b>Despertar muy temprano</b>					
No	42 (100.0)	48 (98.0)	118 (97.5)	82 (95.4)	0.990
Si	0	1 (2.0)	3 (2.5)	4 (4.60)	
<b>Roncar</b>					
No	25 (44.6)	19 (31.2)	47 (29.2)	43 (38.0)	<b>0.036</b>
Si	31 (55.4)	42 (68.8)	114 (70.8)	70 (62.0)	
<b>Buena calidad de sueño</b>					
Si	32 (55.2)	31 (52.5)	87 (49.4)	67 (55.4)	0.320
No	26 (44.8)	28 (47.5)	89 (50.6)	54 (44.6)	

a: Los *p-values* correspondientes a la interacción entre las variables de funcionalidad y los genotipos de *PER3* se estimaron usando un modelo de regresión logística, ampliado para incluir el término de interacción. b: Ajustado por edad y sexo.  $p < 0.05$  considerado estadísticamente significativo.

**Tabla 5: Frecuencias alélicas y genotípicas para el polimorfismo CYP1A1 \*2A, y las delecciones de GSTT1/GSTM1.**

	Casos n=125	Controles n=310
<b>Frecuencias alélicas</b>		
<i>CYP1A1</i>		
T	0,7	0,65
C	0,3	0,35
<b>Frecuencias genotípicas</b>		
	(n)	(n)
<i>GSTT1*null</i>	0,18 (22)	0,18 (55)
<i>GSTM1*null</i>	0,5 (61)	0,47 (140)
<i>CYP1A1</i>		
TT	0,53 (64)	0,47 (140)
TC	0,34 (42)	0,37 (113)
CC	0,13 (16)	0,16 (47)

**Tabla 6: Asociación entre el tabaco, los hábitos dietarios, los polimorfismos en GMX y las enfermedades onco-hematológicas.**

	Casos n=125	Controles n=310	OR (IC 95%)	p
	n (%)	n (%)		
<b>Consumo de tabaco</b>				
Nunca	49 (39,8)	142 (46,4)	Ref.	
Ex-fumadores	47 (38,2)	100 (32,7)	1,36 (0,84-2,19)	0,202
Fumadores	27 (22)	64 (20,9)	1,22 (0,70-2,13)	0,478
<b>Consumo de conservas (enlatados)</b>				
0-2 veces/semana	121 (96,8)	292 (94,8)	Ref.	
3 o más veces/semana	4 (3,2)	16 (5,2)	0,60 (0,14-1,92)	0,370
<b>Consumo de carnes asadas</b>				
0-2 veces/mes	69 (55,2)	217 (70,7)	Ref.	
3 o más veces/mes	56 (44,8)	90 (29,3)	<b>1,72 (1,08-2,75)</b>	<b>0,021<sup>a</sup></b>
<b>Consumo de alcohol</b>				
0-3 veces/semana	110 (88)	268 (86,5)	Ref.	
4 o más veces/semana	15 (12)	42 (13,5)	0,87 (0,43-1,68)	0,665
<b>Consumo de café</b>				
<1 taza/día	90 (72)	259 (83,5)	Ref.	
1 o más tazas/día	35 (28)	51 (16,5)	<b>1,77 (1,03-3,03)</b>	<b>0,037<sup>a</sup></b>
<b>GSTT1</b>				
Presencia	100 (82)	245 (81,7)	Ref.	
Ausencia	22 (18)	55 (18,3)	0,98 (0,54-1,74)	0,942
<b>GSTM1</b>				
Presencia	61 (50)	160 (53,3)	Ref.	
Ausencia	61 (50)	140 (46,7)	1,14 (0,73-1,78)	0,534
<b>CYP1A1</b>				
TT	64 (52,5)	140 (46,7)	Ref.	
TC+CC	58 (47,5)	160 (53,3)	0,79 (0,51-1,24)	0,280

a: Ajustado por edad, sexo y nivel educativo. OR (IC95%): *odds ratio* e intervalo de confianza 95%. Ref.: categoría de referencia.  $p < 0.05$  considerado estadísticamente significativo.

## DISCUSIÓN

### **Análisis de asociación entre el polimorfismo de *PER3*, variables de funcionalidad y las enfermedades onco-hematológicas**

En este estudio, el polimorfismo VNTR de *PER3* mostró estar asociado a un aumento del 39% en el riesgo de enfermedades onco-hematológicas. Al analizar de forma separada los casos de leucemia, los genotipos 4/5 y 5/5 mostraron una asociación estadísticamente significativa con un aumento del doble en el riesgo de enfermedad (OR=1.99, IC95% 1.06–3.74,  $p=0.030$ , ajustado por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia). Los estudios individuales no muestran resultados concluyentes para este polimorfismo<sup>[70,71,116]</sup>. Un meta-análisis realizado por Geng *et al.*<sup>[117]</sup>, combinando tres estudios retrospectivos (2492 pacientes con cáncer y 2749 controles) reportó que los individuos con el alelo de 5 repeticiones tienen un aumento del riesgo de cáncer del 17%, respecto de los individuos con el alelo de 4 repeticiones. Sin embargo, este resultado no fue estadísticamente significativo. Otro estudio en una población americana reportó un aumento significativo en el riesgo de cáncer de mama para mujeres pre-menopáusicas portadoras del alelo de 5 repeticiones<sup>[66]</sup>; sin embargo un estudio similar con mayor número de muestras de origen chino no mostró resultados significativos<sup>[71]</sup>. El trabajo de Alexander *et al.*<sup>[118]</sup> reportó un OR=2.5 (IC95% 1.7-5.4) para los genotipos 4/5+5/5, asociado al desarrollo de adenomas colorrectales. Nuestro trabajo constituye el primer reporte que evalúa la asociación entre el VNTR de *PER3* y el cáncer hematológico, encontrando un aumento en el riesgo asociado a la variante 5.

Un posible mecanismo molecular del impacto funcional del VNTR de *PER3* puede explicarse por la ubicación de esta variación, involucrada en el proceso de fosforilación. La estabilidad y la translocación al núcleo de la proteína *PER3* están reguladas por fosforilación, llevada a cabo por CSNK1. El menor número de residuos aminoacídicos, que son sustratos de fosforilación, en la variante corta de *PER3* posiblemente tenga un impacto funcional en la actividad dependiente de fosforilación<sup>[66]</sup>.

Los pacientes que están atravesando una enfermedad oncológica generalmente presentan disrupción circadiana, ya sea como una reacción fisiológica frente a la presencia del tumor, o bien como resultado de la respuesta endócrina frente a las demandas físicas y emocionales de la enfermedad. A los pacientes con cáncer les toma más tiempo conciliar el sueño, se despiertan durante la noche con mayor frecuencia, pasan más tiempo en la cama y toman más siestas respecto de los individuos sanos<sup>[119,120]</sup>.

Por otro lado, los factores genéticos, ambientales y de comportamiento pueden favorecer la disrupción del ritmo, predisponiendo al organismo al desarrollo tumoral<sup>[121]</sup>. Varios estudios demostraron que el trabajo en turno nocturno, por largos periodos de tiempo, tiene valor pronóstico en el cáncer de mama<sup>[60,122]</sup>.

En este estudio, las variables de comportamiento tales como la fatiga, dificultad para conciliar el sueño, levantarse varias veces durante la noche o los cambios en el apetito o el peso, no mostraron asociación con el cáncer hematológico. Esto puede deberse a que el estudio se basa en población hospitalaria, donde más del 75% de los pacientes control se encontraba tomando algún tipo de medicación al momento de la encuesta (por ejemplo, medicación para enfermedades cardíacas o gástricas; datos no mostrados).

Además, un estudio incluyendo más de 1700 individuos de Buenos Aires, Sao Pablo y México DF mostró que dos tercios de los entrevistados experimentó algún tipo de dificultad en el sueño durante el año previo, y más del 25% de los individuos se encontraba moderada/severamente afectado<sup>[123]</sup>. Entre ellos, los disturbios del sueño más comúnmente reportados durante los últimos 12 meses fueron: despertarse en el medio de la noche (56%), levantarse cansado (55%), dificultad en conciliar el sueño y retomarlo luego de una interrupción (50%) y despertarse demasiado temprano (35%)<sup>[123]</sup>. De hecho, las dificultades en el sueño afectan a una proporción significativa de personas que viven en áreas urbanas, quienes experimentan *jet lag* social y contaminación lumínica<sup>[124,125]</sup>. Dado que estos disturbios empeoran en las enfermedades crónicas, no observamos en nuestro estudio diferencias significativas entre casos y controles. Sin embargo, “experimentar cambios en el humor positivos y negativos” se asoció significativamente a las EOH ( $p < 0.001$  ajustado por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia). En un

paciente oncológico deben tenerse en cuenta varios factores, tales como la historia familiar, el impacto físico y psicológico de la enfermedad, los recursos psíquicos del paciente y el cuidado médico que recibe. Los pacientes con cáncer generalmente sufren *distress*, trastornos de adaptación y ansiedad generados por el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad, espera de resultados, conflictos familiares, miedo a la recaída y a la muerte, y estados metabólicos anormales<sup>[13]</sup>. Por lo tanto, el estado anímico del paciente dependerá de la interacción de todos estos factores, en un escenario más complejo que el de otras enfermedades crónicas. De hecho, la depresión en los pacientes oncológicos es del doble respecto de aquellos pacientes hospitalizados por otros problemas médicos<sup>[13]</sup>.

Al analizar la distribución de los genotipos de *PER3* dentro de los casos y controles, encontramos que los pacientes con cáncer portadores de los genotipos 4/5 o 5/5 experimentan mayor fatiga al despertar. Voinescu *et al.*<sup>[126]</sup> analizaron este polimorfismo, junto a una batería de cuestionarios, en una población con problemas de sueño, encontrando que los individuos homocigotas para el alelo de 5 repeticiones mostraban dificultades al despertar con mayor frecuencia que aquellos con el alelo de 4 repeticiones o heterocigotas. En otro estudio, un grupo de 24 voluntarios sanos fueron sometidos a privación del sueño. Se observó que, durante las horas de la mañana del segundo día de privación del sueño, la *performance* (memoria operativa, atención y desempeño psicomotor) de los individuos con genotipos 5/5 se deterioró significativamente, mientras que esta caída fue menor en los que poseían el genotipo 4/4<sup>[127,128]</sup>. Basándose en la información descrita, nuestros resultados sugieren que los pacientes con genotipos 4/5 y 5/5 podrían sufrir fatiga más intensamente, dado que combinan la disrupción circadiana producto de la patología en sí misma y una susceptibilidad aumentada frente a la falta de sueño debido al genotipo de *PER3*.

Las investigaciones tendientes al esclarecimiento de la conexión molecular entre los genes circadianos y la carcinogénesis serán útiles en la identificación de individuos con mayor riesgo o susceptibilidad a la disrupción circadiana, en tanto dicha disrupción puede disminuir las defensas fisiológicas contra el tumor, al reducir la vigilancia inmunológica y la respuesta inmune, favoreciendo la persistencia de clones celulares anormales<sup>[129]</sup>.

## **Análisis de asociación entre tabaco, hábitos dietarios, polimorfismos de GMX y las enfermedades onco-hematológicas**

La carcinogénesis es un proceso multifactorial y con múltiples instancias, donde participan distintas alteraciones genéticas y varias rutas biológicas. Por eso se espera que los factores de riesgo para el cáncer interactúen entre ellos. Los polimorfismos genéticos pueden jugar diferentes roles en la susceptibilidad al cáncer, de acuerdo al *background* genético, exposiciones ambientales y estilos de vida<sup>[130]</sup>. A pesar de esto, en nuestro estudio no encontramos evidencia de interacción entre los factores de riesgo evaluados, probablemente debido a que la muestra no es lo suficientemente grande para realizar este tipo de análisis.

Respecto al tabaquismo y los hábitos dietarios, reportamos un aumento en el riesgo de EOH asociado al consumo de carne asada/a la parrilla 3 o más veces/mes, y al consumo diario de café (ajustado por edad, sexo y nivel educativo). Además, para estos dos factores se evaluó el riesgo asociado a cada patología por separado, donde la LMC y el MM mostraron asociación significativa con el consumo de carne asada/a la parrilla. Debe tenerse en cuenta que el tamaño muestral se hace muy pequeño al analizar cada patología de forma independiente. Por lo tanto, el efecto real de cada factor de riesgo para cada patología específica debería determinarse en próximos estudios incorporando un set de muestras más grande.

A pesar que el humo del cigarrillo se asoció a efectos mutagénicos/carcinogénicos, inflamación y supresión del sistema inmune tanto en animales como en humanos<sup>[131,132]</sup>, estudios previos sobre este factor de riesgo y su asociación con cánceres hematológicos han generado resultados inconsistentes. Respecto al LNH, los estudios reportan poca o nula asociación con el consumo de cigarrillos o tabaco, o con patrones relacionados a la duración o intensidad de la exposición (detallado en <sup>[133–135]</sup>). En un estudio caso-control realizado en Suecia, los efectos de fumar sobre el riesgo de LMA fueron débiles y no significativos<sup>[136]</sup>. Sin embargo, un estudio de cohorte del mismo país mostró un aumento del 50% en el riesgo de LMA en el grupo de

fumadores<sup>[137]</sup>; este mismo estudio no encontró asociación entre fumadores y ex-fumadores con LMC, LLA, LLC o MM. Un estudio caso-control realizado en India reportó un aumento de 2.1 veces en el riesgo de leucemia en los fumadores respecto de los no fumadores<sup>[138]</sup>. Un estudio de cohorte estadounidense que evaluó factores de riesgo para LMA reportó OR=1.79, 2.42 y 2.29 para ex-fumadores de >1 paquete/día, fumadores de ≤1 paquete/día y fumadores de >1 paquete/día, respectivamente<sup>[139]</sup>. Fircanis *et al.*<sup>[140]</sup> llevaron a cabo un estudio de meta-análisis sobre más de 7500 casos de LMA, encontrando un aumento en el riesgo de enfermedad asociado al hábito de fumar, independientemente del sexo, región geográfica, y diseño y calidad de los estudios. Los mismos investigadores reportaron un aumento del riesgo al aumentar la intensidad y la duración del hábito. Es posible que el nivel de exposición a los agentes presentes en el humo del tabaco varíe, según los distintos patrones de consumo, vías de exposición y procesos manufactureros.

Un estudio reciente realizado por Rubinstein *et al.*<sup>[141]</sup> reportó que el 29.7% de la población general de Argentina, Chile y Uruguay (n=7524) es fumadora. Por otra parte, el estudio CARMELA (*Cardiovascular Risk Factor Multiple Evaluation in Latin America*), llevado adelante entre 2003 y 2005, informó que Buenos Aires (Argentina, n=1482) y Santiago (Chile, n=1655) tienen las mayores prevalencias en tabaquismo de entre las siete ciudades latinoamericanas estudiadas, sin diferencias entre los sexos femenino y masculino (38.6% y 45.4%, respectivamente para cada ciudad)<sup>[142]</sup>. Nuestro estudio reportó que el 20.9% de los controles y el 22% de los casos son fumadores activos, mientras que el 32.7% de los controles y el 38.2% de los casos informaron ser ex-fumadores. Estos resultados probablemente se deban a que nuestro estudio está basado en población hospitalaria, donde se anima fuertemente a los pacientes a abandonar el hábito de fumar. Considerando la alta proporción de personas expuestas al tabaco en nuestra región, resulta de interés continuar evaluando el impacto de este factor de riesgo en el desarrollo de cánceres hematológicos, dada la limitada información disponible hasta el momento.

La dieta, probablemente el factor ambiental con mayor posibilidad de modificación, contribuye al desarrollo del 30-35% de los cánceres<sup>[143]</sup>. Los

estudios de asociación en este campo presentan cierta inconsistencia debido a diferencias en la frecuencia de ingesta de alimentos, variedades disponibles, y un abanico de métodos de preparación entre las distintas poblaciones.

De acuerdo a una publicación reciente del *IARC Monograph Working Group*, el consumo de carne procesada fue clasificado como “carcinogénico para los humanos” (grupo 1<sup>§</sup>), siendo el consumo de carne roja clasificado como “probablemente carcinogénico para los humanos” (grupo 2A)<sup>[144]</sup>. El procesamiento de la carne puede resultar en la formación de compuestos N-nitrosos y HPA, mientras que su cocción produce aminas heterocíclicas aromáticas y HPA. Los métodos de cocción a altas temperaturas, como asar, producen los niveles más altos de estos carcinógenos. La carne roja asada a la parrilla es un plato frecuente en la población argentina, región donde existe un alto consumo de proteínas animales y grasas provenientes principalmente de la carne roja<sup>[145,146]</sup>. Varios estudios epidemiológicos realizados en Córdoba (Argentina) reportaron asociaciones significativas entre el consumo de carne roja, o patrones dietarios que la contienen, y el cáncer de mama, colorrectal, de próstata y urinario<sup>[145-150]</sup>. De acuerdo al trabajo publicado por Navarro *et al.*<sup>[146]</sup>, todos los tipos de carnes se asociaron a un aumento en el riesgo de cáncer colorrectal cuando el método de cocción era asado, un resultado similar al reportado en nuestro trabajo. En otros dos estudios, el patrón dietario “del Cono Sur” (que consiste en el consumo de carne roja, vegetales con almidón y vino) se asoció a un aumento en el riesgo de tumores del tracto urinario<sup>[145]</sup> y de cáncer colorrectal<sup>[147]</sup>. En un caso-control realizado en Uruguay, la carne roja, el cordero y la carne hervida se asociaron a un mayor riesgo de carcinoma de células escamosas del esófago<sup>[151]</sup>.

En relación a las EOH, no se registran hasta el momento estudios realizados con población argentina que evalúen la dieta como factor de riesgo. Varios estudios llevados a cabo en otros países evaluaron esta posible asociación, con resultados inconsistentes. La mayoría de ellos reportan la

---

<sup>§</sup> Grupo 1: Esta categoría se aplica cuando existen *pruebas suficientes de carcinogenicidad en humanos*. Excepcionalmente, un agente puede ser incluido en esta categoría si las pruebas en humanos no son suficientes, pero sí lo son en animales de experimentación, y si existen pruebas contundentes en humanos expuestos acerca que el agente actúa mediante mecanismos relevantes de carcinogenicidad.

ausencia de asociación entre el consumo de carne y un aumento en el riesgo de LNH o LMC<sup>[152-154]</sup>. Un estudio caso-control realizado en Estados Unidos por Li *et al.*<sup>[155]</sup> informó una asociación significativa entre un riesgo mayor de LMA y el consumo de carne vacuna entre las mujeres. Nuestros resultados son los primeros en reportar una asociación estadísticamente significativa entre el riesgo de EOH y el consumo de carne asada para nuestra población. Debe tenerse en consideración que puede existir cierto sesgo en nuestros resultados dado que el tamaño de la porción no fue evaluado, y que no se hizo ninguna distinción entre el consumo de carnes rojas y blancas. A pesar de esto, nuestros resultados son relevantes dada la alta frecuencia de consumo de este tipo de alimentos en Argentina.

Se ha sugerido que el consumo leve a moderado de alcohol tiene efectos beneficiosos al mejorar las respuestas inmunes celulares y humorales<sup>[156]</sup>. Por otro lado, el etanol fue clasificado por la IARC como “carcinogénico para los humanos”. En lo que respecta a las neoplasias malignas hematológicas, un análisis realizado por el Consorcio Internacional de Epidemiología de Linfomas reportó que quienes beben alcohol o lo hicieron alguna vez tienen menor riesgo de desarrollar LNH, comparados con quienes nunca beben<sup>[157]</sup>. Sin embargo, no encontraron una relación dosis-respuesta o una tendencia más fuerte con una mayor duración del hábito. Un meta-análisis a partir de 18 estudios, incluyendo 5694 casos con MM y 7142 con leucemia, no encontró asociación alguna entre el beber alcohol y los riesgos de padecer estas enfermedades<sup>[158,159]</sup>. Li *et al.*<sup>[155]</sup> reportaron una asociación entre el consumo de cerveza y vino y el riesgo de LMA, sólo en las mujeres. Un estudio caso-control de origen italiano no mostró una asociación clara entre leucemia o LNH, y el consumo de alcohol<sup>[135]</sup>. En línea con estas investigaciones, nuestro estudio no encontró asociación alguna entre este factor de riesgo y las EOH estudiadas en nuestra población argentina.

En lo que respecta al consumo de café, no hay evidencia consistente que sugiera un efecto protector o deletéreo. Por un lado, el café puede disminuir el riesgo de cáncer a través de mecanismos antioxidantes, anti-hormonales y anti-inflamatorios<sup>[160]</sup>. Por otro lado, la cafeína y los inhibidores de la topoisomerasa

El presentes en el café pueden elevar el riesgo. Un estudio de cohorte realizado en Estados Unidos reportó la ausencia de asociación entre esta bebida y el riesgo de todos los cánceres combinados; sin embargo encontraron una disminución en el riesgo de cáncer de endometrio en aquellas mujeres que tomaban una o más tazas por día<sup>[161]</sup>. A pesar que algunos estudios en tumores sólidos reportaron un efecto protector (por ejemplo, en cáncer hepático, colorrectal, de mama y endometrio<sup>[162-165]</sup>), los estudios sobre el cáncer hematológico en población adulta son escasos. En nuestro estudio, el consumo diario de café se asoció a un aumento en el riesgo de enfermedad. Un caso-control con población india mostró una reducción del 40% en el riesgo de leucemia para aquellos que tomaban café<sup>[138]</sup>, mientras que un estudio italiano similar reportó un incremento en el riesgo de LNH asociado al consumo<sup>[166]</sup>. Otros análisis no encontraron evidencia significativa de asociación entre el consumo de café y las EOH<sup>[167-169]</sup>. En 1991, el *IARC Working Group* clasificó al café como “posiblemente carcinogénico para los humanos” (grupo 2B<sup>h</sup>). Dado el gran número de estudios publicados hasta la fecha, respecto a este tema, el *IARC Advisory Group* recomendó revisar la evidencia disponible, otorgándole alta prioridad para la inclusión en las monografías de la *IARC* a publicarse entre 2015 y 2019<sup>[170]</sup>. En concordancia con esto, en junio de 2016 el *IARC Working Group* lanzó una publicación con los resultados de la evaluación realizada sobre la carcinogenicidad del café, el mate y otras bebidas muy calientes. El café fue bajado de categoría, hacia “no clasificable en cuanto a su carcinogenicidad en seres humanos” (Grupo 3)<sup>[171]</sup>. Esto significa que existe inadecuada evidencia de carcinogenicidad en humanos, e inadecuada o limitada evidencia en animales experimentales.

---

<sup>h</sup> Grupo 2B: en esta categoría se incluyen agentes, mezclas o condiciones de exposición para los que existen *pruebas limitadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas insuficientes de carcinogenicidad en animales de experimentación*. También puede ser utilizada cuando existan pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos pero suficientes en experimentación animal. Ocasionalmente, un agente, mezcla o condición de exposición puede ser incluido en este grupo si existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos, pero limitadas de carcinogenicidad en animales de experimentación, junto con otros datos significativos de apoyo.

Las variaciones genéticas en los GMX pueden ser importantes factores en la etiología de las EOH. A pesar que tienen baja penetrancia, son altamente prevalentes en la mayoría de las poblaciones, lo que permite identificar potenciales carcinógenos y poblaciones con mayores niveles de riesgo de cáncer<sup>[172]</sup>. Estos polimorfismos también interactúan con otros polimorfismos y/o con factores ambientales particulares, los cuales varían entre y dentro los grupos étnicos<sup>[130]</sup>. La mayor actividad de la variante CYP1A1\*2A, o la mayor capacidad de ser inducida, podría contribuir a la acumulación de cambios genéticos debido a un aumento en la producción de agentes mutagénicos<sup>[173]</sup>. De manera similar, el descenso en la actividad de GSTs debido a la delección génica puede llevar a un estrés oxidativo más intenso, aumentando el nivel de daño al ADN<sup>[174]</sup>.

Respecto al polimorfismo *MspI* de *CYP1A1*, sus frecuencias alélicas varían según los grupos étnicos, tomando valores de 0.058, 0.149 y 0.218 para el alelo C (\*2A) en caucásicos, asiáticos y africanos, respectivamente<sup>[175]</sup>. Roco *et al.*<sup>[176]</sup> reportaron una frecuencia para el alelo \*2A en población chilena de 0.37. En nuestro estudio, las frecuencias encontradas para el alelo \*2A fueron 0.34 para los controles y 0.30 para los casos, similar a lo descrito para la población chilena y marcadamente diferente a lo reportado para caucásicos. Nuestros datos genotípicos para este polimorfismo se desvían del equilibrio de Hardy-Weinberg; esto puede deberse a que la muestra no represente la variabilidad de la población entera, o debido a errores de genotipado que creen un sesgo hacia el incremento de la homocigosidad.

Nuestro estudio de asociación entre el polimorfismo *MspI* de *CYP1A1* y el cáncer hematológico arrojó un OR=0.79 (IC95% 0.51-1.24), sin significancia estadística. Los estudios de asociación entre este polimorfismo y el cáncer han sido inconsistentes. Un meta-análisis que reunió 268 estudios individuales realizado por He *et al.*<sup>[130]</sup> reportó asociación entre la variante \*2A y un aumento en el riesgo de leucemia, cáncer cervical, hepatocelular, de cabeza y cuello, pulmón y próstata, sin resultados significativos para los demás tipos de cáncer evaluados. Otro meta-análisis llevado a cabo por Han *et al.*<sup>[177]</sup> mostró un aumento en el riesgo de leucemia asociado a esta variante, que se mantuvo significativo para la población caucásica al estratificar por etnia. El mismo estudio reportó un aumento en el riesgo de LLA y LMA asociado a la variante,

especialmente para LLA en niños caucásicos. Entre los asiáticos, el estudio de Lu *et al.*<sup>[178]</sup> mostró que la variante \*2A incrementó el riesgo de LMA. Por otro lado, el meta-análisis realizado por Zhuo *et al.*<sup>[179]</sup> no encontró asociaciones significativas entre la variante en análisis y el riesgo de LMA.

Varios estudios analizaron la posible asociación entre el cáncer hematológico y las deleciones de *GSTT1* y *GSTM1*, con resultados dispares. En nuestro estudio, las frecuencias de los genotipos nulos fueron 0.18 en los casos y los controles para *GSTT1*, y 0.5 y 0.47 en los casos y los controles, respectivamente, para *GSTM1*. Las frecuencias reportadas para *GSTT1*\*nulo son 0.13-0.26 en los caucásicos<sup>[175]</sup>, 0.10-0.12 para poblaciones chilenas y argentinas<sup>[176,180-182]</sup>, y 0.09-0.24 para argentinos nativos-americanos<sup>[183]</sup>. La deleción de *GSTM1* presenta frecuencias mayores, con valores de 0.42-0.60 para caucásicos<sup>[175]</sup>, 0.36-0.46 para poblaciones chilenas y argentinas<sup>[176,180-182]</sup>, y 0.29-0.49 para argentinos nativos-americanos<sup>[183]</sup>. Nuestro estudio de asociación arrojó un OR=0.98 (IC95% 0.54-1.74) al analizar la deleción de *GSTT1*, y un OR=1.14 (IC95% 0.73-1.78) para la deleción de *GSTM1*. He *et al.*<sup>[172]</sup> llevaron a cabo un meta-análisis, donde concluyeron que la deleción de *GSTM1* incrementaba significativamente el riesgo de LMA en asiáticos del este, mientras que el genotipo nulo de *GSTT1* lo hacía en caucásicos. Los genotipos nulos-dobles se asociaron a LMA en ambos grupos étnicos. Varios estudios caso-control informaron asociaciones significativas entre el genotipo nulo de *GSTT1* y la LMA, LMC, LLC y las leucemias agudas<sup>[184-190]</sup>. Contrariamente, otros estudios no encontraron estas asociaciones al analizar el polimorfismo y las leucemias en su conjunto, leucemias agudas, LMC, LMA o MM<sup>[181,191-194]</sup>. Un panorama similar ocurre con la deleción de *GSTM1*: varios estudios reportan incrementos significativos en el riesgo de LNH, LLC, LMA, MM, LMC y leucemias agudas asociados al genotipo nulo<sup>[184,185,188,190,195,196]</sup>, mientras que otros tantos estudios no muestran diferencias en el riesgo de cáncer entre los controles y los casos con LMC, LMA, MM, leucemias agudas y leucemias en su conjunto<sup>[186,187,189,191-194]</sup>. De forma general, los análisis arrojan OR moderados, con valores que van de 1 a 3; sin embargo, en algunos análisis se alcanzaron valores de hasta 7, con valores de OR aún mayores al analizar los genotipos nulos-dobles. Es importante remarcar que todos estos estudios caso-control se

realizaron en diferentes países, con distintos *backgrounds* genéticos y con números variables de participantes.

### **Respecto de los diseños caso-control**

Los estudios caso-control tienen la ventaja de requerir un número menor de individuos (respecto a otros tipos de estudios), además se realizan en un tiempo corto y son adecuados para enfermedades crónicas o de aparición tardía. Estas características los convierten en una herramienta útil para estudios que buscan factores de riesgo asociados al cáncer. Sin embargo, llevar a cabo un caso-control adecuado puede resultar costoso, demandar mayor tiempo y presentar ciertas dificultades en su diseño.

Respecto a la selección de las muestras, hay varios puntos importantes a analizar, con el fin de tener en cuenta su impacto sobre los resultados de la presente tesis:

- En los estudios caso-control, los casos deben ser representativos de la población enferma: en este trabajo, las muestras de tumores hematológicos provienen de un hospital público. Dado que la subpoblación que se atiende en estas instituciones puede ser diferente de aquella que se atiende en clínicas privadas, las muestras de casos pueden no ser representativas de todos los casos de cáncer hematológico en la población. Además, los casos provienen de un solo hospital, y no de varias instituciones, lo que dificulta la aplicación de los resultados a la población general.

- Los controles deben ser representativos de toda la población, o del grupo en esa población que no está afectado por la enfermedad: este es el punto crítico de los estudios caso-control. Para la presente tesis, fue posible acceder a un grupo control de la misma población que los casos (población hospitalaria), alcanzando una relación caso:control de aproximadamente 1:3.

- La estratificación poblacional puede generar asociaciones genotipo-enfermedad. En los estudios caso-control sin un adecuado pareamiento de los sujetos, es posible que la mayoría de los casos provengan de una subpoblación donde la enfermedad es más frecuente, así como la gran parte de los controles provendrán de una subpoblación donde ésta es menos frecuente. Lo mismo sucede con las frecuencias de los alelos involucrados en el estudio (pueden distribuirse de diferente manera entre las subpoblaciones).

En muchas ocasiones, estas subpoblaciones o estratos se corresponden con grupos étnicos, en los que existen diferencias tanto en las frecuencias de alelos de marcadores genéticos como en la prevalencia/incidencia de ciertas enfermedades. En la presente tesis, los resultados se ajustaron por edad, sexo, nivel educativo y lugar de residencia. El lugar de nacimiento no resultó ser un factor por el cual corregir los resultados, por lo que no se lo tuvo en consideración para realizar los análisis.

Nuestro estudio presenta algunas fortalezas que vale la pena mencionar. Las entrevistas fueron realizadas cara a cara y por el mismo entrevistador, con todos los participantes, asegurando la obtención de datos confiables y consistentes. Además, si bien el tamaño muestral es pequeño, tiene una potencia estadística para detectar un  $OR=2$ , valor cercano a los reportes de estudios caso-control similares. A pesar que casos y controles no están pareados por sexo y edad, se utilizaron ajustes estadísticos para minimizar los potenciales sesgos, tal como se explicó antes. Es importante tener en cuenta que nuestros resultados se obtuvieron a partir de un cuestionario no validado, y que se conseguirían aproximaciones más precisas usando herramientas validadas. Debe recordarse también, que los estudios basados en población hospitalaria pueden tener cierto nivel de sesgo, debido a que los pacientes controles pueden estar afectados por alguna enfermedad benigna con posibilidad de transformarse en maligna. Por otro lado, el conjunto de EOH es heterogéneo, con causas potencialmente diferentes. Un número mayor de muestras nos permitirá realizar análisis de factores de riesgo para cada patología por separado. Por último, se debe tener discreción al extrapolar los resultados de una población a otra, dadas las diferentes composiciones étnicas de las poblaciones reportadas en la bibliografía.

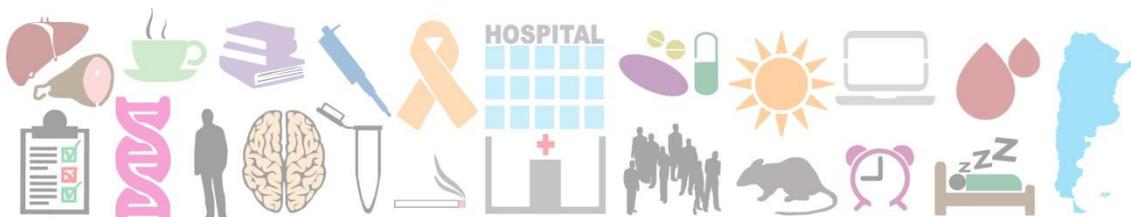
## CONCLUSIONES PARCIALES

Los datos descriptos muestran que el VNTR de *PER3* podría tener un rol en el riesgo de leucemia, y que podría ser un marcador de las diferencias individuales en el sueño y la vulnerabilidad a su disrupción.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que los pacientes oncológicos en la población estudiada sufren cambios de humor, tanto positivos como negativos, con mayor frecuencia respecto de otros pacientes, sanos o con patologías no relacionadas al cáncer. Estos datos podrían ser de utilidad para el sistema sanitario que atiende y contiene a los pacientes oncológicos.

Respecto a los GMX, hábitos dietarios y tabaquismo, nuestro estudio ofrece datos relevantes relacionados a la etiología de las EOH, en especial lo concerniente al consumo de carnes asadas: un hábito ampliamente practicado en nuestro país, y que se presenta -a partir de nuestro estudio- como un factor de riesgo para estas enfermedades. Dada la incidencia media-alta de cáncer en Argentina, los estudios que evalúen posibles factores de riesgo frecuentemente encontrados en la población, contribuirán a dilucidar cuáles de ellos están involucrados en la incidencia actual de las EOH -y de otros tipos de cáncer- para nuestro país.

## CONSIDERACIONES FINALES

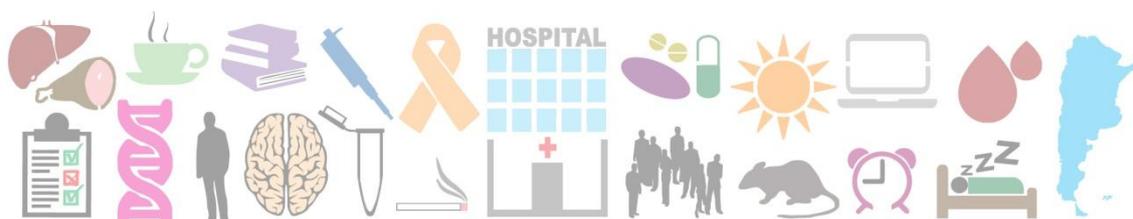


A través de un modelo murino de desincronización forzada por JLC, combinado con un protocolo de tumorigénesis experimental, evidenciamos alteraciones en la expresión de genes reloj y GMX, tanto a nivel de los NSQ como en tejidos periféricos (hígado y tumor). Estas alteraciones, producto del desarrollo del tumor y/o de la condición crónica de desincronización forzada en los animales, dan cuenta de las vinculaciones existentes entre los sistemas circadiano, metabólico y tumoral, tal como se aprecia en el creciente número de investigaciones realizadas sobre este tema, cuyos resultados refuerzan estas hipótesis. Estos modelos experimentales son de gran relevancia para dilucidar los mecanismos que promueven el desarrollo de patologías epidemiológicamente establecidas, como ciertos tipos de cáncer o el síndrome metabólico, en personas que experimentan trastornos circadianos crónicos, como los trabajadores nocturnos o en turnos rotativos.

Por otra parte, el diseño caso-control con pacientes oncológicos nos permitió comenzar a describir aspectos relevantes de la etiología de las EOH, mostrando que determinados componentes genéticos y ambientales estarían modificando la predisposición de nuestra población a padecer estas enfermedades. Los resultados obtenidos en este trabajo para algunos factores de riesgo, constituyen los primeros en ser reportados para nuestra población y para las EOH, específicamente.

Los estudios que busquen dilucidar las relaciones entre el sistema circadiano, los procesos metabólicos y el desarrollo tumoral, y cómo éstos se ven afectados por factores genéticos, disrupción del ritmo (*jet lag* social, trabajo en turnos rotativos) o exposiciones ambientales (compuestos carcinogénicos, hábitos de vida) contribuirán a: 1) alcanzar mejores tratamientos oncológicos - que maximicen los efectos deseados y minimicen los adversos-, 2) diseñar sistemas de trabajo por turnos con el menor impacto posible sobre la salud de los trabajadores, y sistemas que consideren aspectos dietarios y hábitos de consumo, y 3) identificar poblaciones con mayor riesgo de cáncer, sobre las cuales aplicar estrategias de prevención y reducción del riesgo.

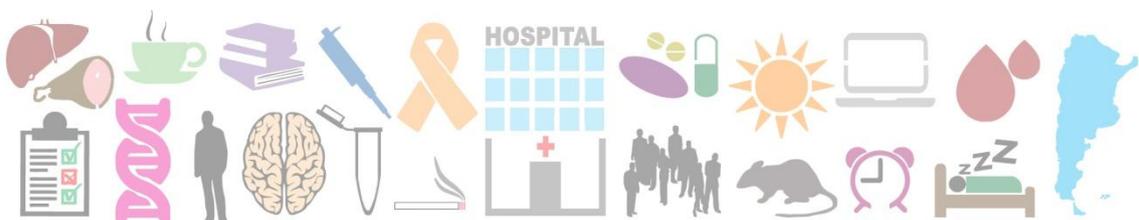
**PUBLICACIONES A PARTIR DE  
ESTA TESIS DOCTORAL**



Parte de los resultados obtenidos en esta tesis doctoral fueron publicados en revistas internacionales con referato:

- Cerliani MB; Gili, JA; Pavicic, W; Klein, G; Saba, S; Richard SM. “Association between PER3 length polymorphism and onco-hematological diseases and its influence on patient’s functionality”. *Adv Mod Oncol Res*. 2015;1(2):132-140. DOI: 10.18282/amor.v1.i2.44
- Cerliani, MB; Pavicic, W; Gili, JA; Klein, G; Saba, S; Richard, SM. “Cigarette smoking, dietary habits and genetic polymorphisms in GSTT1, GSTM1 and CYP1A1 metabolic genes: A case-control study in oncohematological diseases”. *World J Clin Oncol*. 2016; 7(5):395-405. DOI: 10.5306/wjco.v7.i5.395
- Weich, N; Roisman, A; Cerliani, MB; Araoz, V; Chertkoff, L; Richard, S; Larripa, I; Slavutsky, I; Fundia, A. “Gene polymorphism profiles of drug-metabolizing enzymes GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in an Argentinean population”. *Annals of Human Biology*. 2016. DOI: 10.1080/03014460.2016.1259429

# BIBLIOGRAFÍA



---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centro de Prensa - Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Nota descriptiva N°297. 2015;
2. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature* 2009;**458**:719–24 [DOI: 10.1038/nature07943]
3. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;**144**:646–74 [PMID: 21376230 DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013]
4. McFarland C, Korolev K, Kryukov G, Sunyaev S, Mirny L. Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression. *PNAS* 2013;**110**:2910–5 [PMID: 23388632 DOI: 10.1073/pnas.1213968110]
5. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, Downing JR. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2008;**322**:1377–80 [PMID: 19039135 DOI: 10.1126/science.1164266]
6. Roche-Lestienne C, Soenen-Cornu V, Grardel-Duflos N, Laï J-L, Philippe N, Facon T, Fenaux P, Preudhomme C. Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to ST1571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 2002;**100**:1014–8 [PMID: 12130516 DOI: 10.1182/blood.V100.3.1014]
7. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability - an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;**11**:220–8 [PMID: 20177397 DOI: 10.1038/nrm2858]
8. Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, DePinho RA, Weinberg R. Cancer: Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
9. Organización Mundial de la Salud. Programas Nacionales de Control del Cáncer: políticas y pautas para la gestión. 2004;
10. Red Argentina de Cáncer Familiar, Plan Nacional de Tumores Familiares y Hereditarios, Instituto Nacional del Cáncer. Reporte Anual. 2015.
11. American Cancer Society. Datos y Estadísticas sobre el Cáncer entre los Hispanos/Latinos 2012-2014. 2012;
12. Holland J, Breitbart W, Butow P, Jacobsen P, Loscalzo M, McCorkle R. Psycho-Oncology. 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2015.
13. Sala V. La interconsulta psiquiátrica y psicológica en pacientes con cáncer. *Rev Colomb Psiquiatr* 2002;**XXXI**:225–36
14. García P, Aguilar P. Distrés y cáncer. *Rev Neurol Neurocir y Psiquiatr* 2006;**39**:52–8
15. Ministerio de Salud, Instituto Nacional del Cáncer. Atlas de Mortalidad por Cáncer, Argentina 2007-2011. 2011.

16. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D, Forman D, Bray F. Incidence/mortality data [Internet]. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incid. Mortal. Worldw. IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer.2013;Available from: <http://globocan.iarc.fr>
17. Williams J a, Phillips DH. Mammary expression of xenobiotic metabolizing enzymes and their potential role in breast cancer. *Cancer Res* 2000;**60**:4667–77 [PMID: 10987265]
18. Silbergeld EK. Toxicología. Herramientas y enfoques. En: Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. 1998.
19. Claudel T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F. Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett* 2007;**581**:3626–33 [PMID: 17451689 DOI: 10.1016/j.febslet.2007.04.009]
20. Haider R, Robin M-A, Fang J-K, Avadhani NG. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* 2002;**366**:45–55 [PMID: 1222767 DOI: 10.1042/BJ20020533]
21. Kalow W. Pharmacogenetics of drug metabolism. New York: Pergamon Press; 1992.
22. Kalow W. Pharmacogenetics: heredity and the response to drugs. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1962.
23. Evans WE. Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics. *Science* 1999;**286**:487–91 [PMID: 10521338 DOI: 10.1126/science.286.5439.487]
24. Nebert DW. Genes encoding drug-metabolizing enzymes: possible role in human disease. *Basic Life Sci* 1988;**43**:45–8 [PMID: 2896496]
25. Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant “warfare”, molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 1990;**6**:182–6 [PMID: 2196721 DOI: 10.1016/0168-9525(90)90174-5]
26. Nebert DW, Weber WW. Pharmacogenetics. En: Pratt WB, Taylor P. Principles of Drug Action. The Basis of Pharmacology. New York: Churchill-Livingston; 1990.
27. Gonzalez FJ, Tukey RH. Drug Metabolism: How Humans Cope with Exposure to Xenobiotics. En: Goodman and Gilman’s the Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill; 2012. página 71–91
28. Lo H-W, Ali-Osman F. Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 2007;**7**:367–74 [PMID: 17681492 DOI: 10.1016/j.coph.2007.06.009]
29. Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000;**464**:65–76 [PMID: 10633178 DOI: 10.1016/S1383-5718(99)00167-9]
30. Zhou S, Liu J, Chowbay B, Zhou S, Liu J, Chowbay B. Polymorphism of human

- cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 2009;**41**:89–295 [PMID: 19514967 DOI: 10.1080/03602530902843483]
31. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 “pie”. *Drug Metab Dispos* 2006;**34**:880–6 [PMID: 16467132 DOI: 10.1124/dmd.105.008672]
  32. Lin JH, Lu AYH. Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;**41**:535–67 [PMID: 11264468 DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.535]
  33. Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 2002;**360**:1155–62 [PMID: 12387968 DOI: 10.1016/S0140-6736(02)11203-7]
  34. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 2007;**116**:496–526 [PMID: 18001838 DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.09.004]
  35. Kirchheiner J, Seeringer A. Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta* 2007;**1770**:489–94 [PMID: 17113714 DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.09.019]
  36. Guengerich FP, Shimada T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 1998;**400**:201–13 [PMID: 9685642]
  37. Spurr NK, Gough AC, Stevenson K, Wolf CR. Msp-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15. *Nucleic Acids Res* 1987;**15**:5901 [PMID: 2886977]
  38. Shah PP, Saurabh K, Pant MC, Mathur N, Parmar D. Evidence for increased cytochrome P450 1A1 expression in blood lymphocytes of lung cancer patients. *Mutat Res* 2009;**670**:74–8 [PMID: 19632247 DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.07.006]
  39. Hollman AL, Tchounwou PB, Huang H. The Association between Gene-Environment Interactions and Diseases Involving the Human GST Superfamily with SNP Variants. *Int J Environ Res Public Heal* 2016;**13**:1–14 [PMID: 27043589 DOI: 10.3390/ijerph13040379]
  40. Hernández-Rosas F, Santiago-García J. Ritmos circadianos , genes reloj y cáncer. *Arch Med* 2010;**6**:1–8 [DOI: 10.3823/059]
  41. Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular basis of circadian rhythms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;**17**:215–53 [PMID: 11687489 DOI: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.215]
  42. Sehgal A. *Molecular Biology of Circadian Rhythms*. Wiley; 2004.
  43. Schibler U, Ripperger J, Brown SA. Peripheral Circadian Oscillators in Mammals: Time and Food. *J Biol Rhythm* 2003;**18**:250–60 [PMID: 20148687 DOI: 10.1177/0748730403253381]
  44. Levi F, Schibler U. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications.

- Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007;**47**:593–628 [PMID: 17209800 DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208]
45. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002;**418**:935–41 [PMID: 12198538 DOI: 10.1038/nature00965]
  46. Kalsbeek A, Palm I, La Fleur S, Scheer F, Perreau-Lenz S, Ruitter M, Kreier F, Cailotto C, Buijs RM. SCN Outputs and the Hypothalamic Balance of Life. *J Biol Rhythms* 2006;**21**:458–69 [DOI: 10.1177/0748730406293854]
  47. Aton SJ, Herzog ED. Come Together, Right... Now: Synchronization of Rhythms in a Mammalian Circadian Clock. *Neuron* 2005;**48**:531–4 [PMID: 16301169 DOI: 10.1016/j.neuron.2005.11.001]
  48. King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu Rev Neurosci* 2000;**23**:713–42 [PMID: 10845079 DOI: 10.1146/annurev.neuro.23.1.713]
  49. Stokkan K-A, Yamazaki S, Tei H, Sakaki Y, Menaker M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science (80- )* 2001;**291**:490–3 [PMID: 11161204 DOI: 10.1126/science.291.5503.490]
  50. Brown SA, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr Biol* 2002;**12**:1574–83 [PMID: 12372249 DOI: 10.1016/S0960-9822(02)01145-4]
  51. Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci* 1967;**58**:1762–7 [PMID: 5237901]
  52. Takahashi JS, Hong H-K, Ko CH, McDearmon EL. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet* 2008;**9**:764–75 [PMID: 18802415 DOI: 10.1038/nrg2430]
  53. Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:350–61 [PMID: 12724733 DOI: 10.1038/nrc1072]
  54. Lim C, Allada R. Emerging roles for post-transcriptional regulation in circadian clocks. *Nat Neurosci* 2013;**16**:1544–50 [PMID: 24165681 DOI: 10.1038/nn.3543]
  55. Zhao Z, Lee C. Circadian Clock, Cell Cycle and Cancer. En: Albrecht U. *The Circadian Clock*. New York: Springer; 2010. página 139–55
  56. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Painting, Firefighting, and Shiftwork. Lyon, France: 2010.
  57. Myers J. Proinflammatory Cytokines and Sickness Behavior: Implications for Depression and Cancer-Related Symptoms. *Oncol Nurs Forum* 2008;**35**:802–7 [PMID: 18765326 DOI: 10.1188/08.ONF.802-807]
  58. Filipski E, King VM, Li X, Granda TG, Mormont M-C, Liu X, Claustrat B, Hastings MH, Lévi F. Host circadian clock as a control point in tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 2002;**94**:690–7 [PMID: 11983758 DOI: 10.1093/jnci/94.9.690]
  59. Stevens RG. Circadian Disruption and Breast Cancer: from melatonin to clock

- genes. *Epidemiology* 2005;**16**:254–8 [PMID: 15703542 DOI: 10.1097/01.ede.0000152525.21924.54]
60. Schernhammer ES, Speizer FE, Walter C, Hunter DJ, Colditz GA. Rotating Night Shifts and Risk of Breast Cancer in Women Participating in the Nurses' Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**:1563–8 [PMID: 11604480 DOI: 10.1093/jnci/93.20.1563]
61. Lin X, Chen W, Wei F, Ying M, Wei W, Xie X. Night-shift work increases morbidity of breast cancer and all-cause mortality: a meta-analysis of 16 prospective cohort studies. *Sleep Med* 2015;**16**:1381–7 [PMID: 26498240 DOI: 10.1016/j.sleep.2015.02.543]
62. Papantoniou K, Castaño-Vinyals G, Espinosa A, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Burgos J, Gómez-Acebo I, Llorca J, Peiró R, Jimenez-Moleón JJ, Arredondo F, Tardón A, Pollán M, Kogevinas M. Night shift work, chronotype and prostate cancer risk in the MCC-Spain case-control study. *Int J cancer* 2015;**137**:1147–57 [PMID: 25530021 DOI: 10.1002/ijc.29400]
63. Casiraghi LP, Oda GA, Chiesa JJ, Friesen WO, Golombek DA. Forced Desynchronization of Activity Rhythms in a Model of Chronic Jet Lag in Mice. *J Biol Rhythm* 2012;**27**:59–69 [PMID: 22306974 DOI: 10.1177/0748730411429447]
64. Casiraghi L, Alzamendi A, Giovambattista A, Chiesa JJ, Golombek DA. Effects of chronic forced circadian desynchronization on body weight and metabolism in male mice. *Physiol Rep* 2016;**4**:1–12 [PMID: 27125665 DOI: 10.14814/phy2.12743]
65. Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H. Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science (80-)* 2003;**302**:255–9 [PMID: 12934012 DOI: 10.1126/science.1086271]
66. Zhu Y, Brown HN, Zhang Y, Stevens RG, Zheng T. Period3 structural variation: a circadian biomarker associated with breast cancer in young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:268–70 [PMID: 15668506]
67. Hoffman AE, Yi C-H, Zheng T, Stevens RG, Leaderer D, Zhang Y, Holford TR, Hansen J, Paulson J, Zhu Y. CLOCK in breast tumorigenesis: genetic, epigenetic, and transcriptional profiling analyses. *Cancer Res* 2010;**70**:1459–68 [PMID: 20124474 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3798]
68. Zhu Y, Stevens RG, Leaderer D, Hoffman A, Holford T, Zhang Y, Brown HN, Zheng T. Non-synonymous polymorphisms in the circadian gene NPAS2 and breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2008;**107**:421–5 [PMID: 17453337 DOI: 10.1007/s10549-007-9565-0]
69. Zhu Y, Leaderer D, Guss C, Brown HN, Zhang Y, Boyle P, Stevens RG, Hoffman A, Qin Q, Han X, Zheng T. Ala394Thr polymorphism in the clock gene NPAS2: a circadian modifier for the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 2006;**120**:432–5 [PMID: 17096334 DOI: 10.1002/ijc.22321]
70. Chu LW, Zhu Y, Yu K, Zheng T, Yu H, Zhang Y, Sesterhenn I, Chokkalingam AP, Danforth KN, Shen M-C, Stanczyk FZ, Gao Y-T, Hsing AW. Variants in circadian genes and prostate cancer risk: a population-based study in China.

- Prostate Cancer Prostatic Dis* 2008;**11**:342–8 [PMID: 17984998 DOI: 10.1038/sj.pcan.4501024]
71. Dai H, Zhang L, Cao M, Song F, Zheng H, Zhu X, Wei Q, Zhang W, Chen K. The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;**127**:531–40 [PMID: 20978934 DOI: 10.1007/s10549-010-1231-2]
  72. Chen Z, McKnight SL. A conserved DNA damage response pathway responsible for coupling the cell division cycle to the circadian and metabolic cycles. *Cell cycle* 2007;**6**:2906–12 [PMID: 18000400 DOI: 10.4161/cc.6.23.5041]
  73. Sahar S, Sassone-Corsi P. Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer* 2009;**9**:886–96 [PMID: 19935677 DOI: 10.1038/nrc2747]
  74. Green CB, Takahashi JS. Xenobiotic metabolism in the fourth dimension: PARTners in time. *Cell Metab* 2006;**4**:3–4 [PMID: 16814724 DOI: 10.1016/j.cmet.2006.06.004]
  75. Lim FL, Currie R a, Orphanides G, Moggs JG. Emerging evidence for the interrelationship of xenobiotic exposure and circadian rhythms: a review. *Xenobiotica* 2006;**36**:1140–51 [PMID: 17118921 DOI: 10.1080/00498250600861819]
  76. Akhtar RA, Reddy AB, Maywood ES, Clayton JD, King VM, Smith AG, Gant TW, Hastings MH, Kyriacou CP. Circadian Cycling of the Mouse Liver Transcriptome, as Revealed by cDNA Microarray, Is Driven by the Suprachiasmatic Nucleus. *Curr Biol* 2002;**12**:540–50 [DOI: 10.1016/S0960-9822(02)00759-5]
  77. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay S a, Takahashi JS, Hogenesch JB. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* 2002;**109**:307–20 [PMID: 12015981 DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00722-5]
  78. Zhang YJ, Yeager RL, Klaassen CD. Circadian Expression Profiles of Drug-Processing Genes and Transcription Factors in Mouse Liver. *Drug Metab Dispos* 2009;**37**:106–15 [PMID: 18838502 DOI: 10.1124/dmd.108.024174.Hepatobiliary]
  79. Morgan KT, Jayyosi Z, Hower MA, Pino M V, Connolly TM, Kotlenga K, Lin J, Wang M, Schmidts H-L, Bonnefoi MS. The hepatic transcriptome as a window on whole-body physiology and pathophysiology. *Toxicol Pathol* 2005;**33**:136–45 [PMID: 15805065 DOI: 10.1080/01926230590522149]
  80. Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G, Ohkura N, Azama T, Mesaki M, Yukimasa S, Kobayashi H, Iitaka C, Umehara T, Horikoshi M, Kudo T, Shimizu Y, Yano M, Monden M, Machida K, Matsuda J, Horie S, Todo T, Ishida N. Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem* 2003;**278**:41519–27 [PMID: 12865428 DOI: 10.1074/jbc.M304564200]
  81. Gachon F, Firsov D. The role of circadian timing system on drug metabolism and detoxification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2011;**7**:147–58 [PMID: 21192771 DOI: 10.1517/17425255.2011.544251]

82. Nakahata Y, Kaluzova M, Grimaldi B, Sahar S, Hirayama J, Chen D, Guarente LP, Sassone-Corsi P. The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 2008;**134**:329–40 [PMID: 18662547 DOI: 10.1016/j.cell.2008.07.002]
83. Dallmann R, Brown SA, Gachon F. Chronopharmacology: New Insights and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2014;**6**:1–25 [PMID: 24160700 DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135923]
84. Hoffman AE, Zheng T, Stevens RG, Ba Y, Zhang Y, Leaderer D, Yi C, Holford TR, Zhu Y. Clock-cancer connection in non-Hodgkin's lymphoma: a genetic association study and pathway analysis of the circadian gene cryptochrome 2. *Cancer Res* 2009;**69**:3605–13 [PMID: 19318546 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4572]
85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ddCt Method. *Methods* 2001;**25**:402–8 [PMID: 11846609 DOI: 10.1006/meth.2001.1262]
86. Gillette M, Tyan S. Circadian Gene Expression in the Suprachiasmatic Nucleus. *Encycl Neurosci* 2009;901–8 [DOI: 10.1016/B978-008045046-9.01596-5]
87. Iwamoto A, Kawai M, Furuse M, Yasuo S. Effects of chronic jet lag on the central and peripheral circadian clocks in CBA / N mice. *Chronobiol Int* 2014;**31**:189–98 [PMID: 24147659 DOI: 10.3109/07420528.2013.837478]
88. Yamamoto T, Nakahata Y, Soma H, Akashi M, Mamine T, Takumi T. Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Mol Biol* 2004;**5**:18 [PMID: 15473909 DOI: 10.1186/1471-2199-5-18]
89. Xu Y-Q, Zhang D, Jin T, Cai D-J, Wu Q, Lu Y, Liu J, Klaassen CD. Diurnal variation of hepatic antioxidant gene expression in mice. *PLoS One* 2012;**7**:e44237 [PMID: 22952936 DOI: 10.1371/journal.pone.0044237]
90. Inoue N. Circadian variation of hepatic glutathione S-transferase activities in the mouse. *Xenobiotica* 1999;**29**:43–51 [PMID: 10078839 DOI: 10.1080/004982599238803]
91. Zmrzljak UP, Rozman D. Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: the time matters. *Chem Res Toxicol* 2012;**25**:811–24 [PMID: 22303888 DOI: 10.1021/tx200538r]
92. Wu M, Zeng J, Chen Y, Zeng Z, Zhang J, Cai Y, Ye Y, Fu L, Xian L, Chen Z. Experimental chronic jet lag promotes growth and lung metastasis of Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice. *Oncol Rep* 2012;**27**:1417–28 [PMID: 22344888 DOI: 10.3892/or.2012.1688]
93. Filipski E, Innominato PF, Wu M, Li X-M, Iacobelli S, Xian L-J, Lévi F. Effects of light and food schedules on liver and tumor molecular clocks in mice. *J Natl Cancer Inst* 2005;**97**:507–17 [PMID: 15812076 DOI: 10.1093/jnci/dji083]
94. Filipski E, Delaunay F, King VM, Wu M, Claustrat B, Grechez-Cassiau A, Guettier C, Hastings MH, Francis L. Effects of Chronic Jet Lag on Tumor Progression in Mice Effects of Chronic Jet Lag on Tumor Progression in Mice. *Cancer Res* 2004;**64**:7879–85 [PMID: 15520194 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-

04-0674]

95. Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Lee C, Moore DD, Fu L, Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Coarfa C, Sreekumar A, Putluri N. Circadian Homeostasis of Liver Metabolism Suppresses Hepatocarcinogenesis. *Cancer Cell* 2016;**30**:1–16 [PMID: 27889186 DOI: 10.1016/j.ccell.2016.10.007]
96. Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab* 2006;**4**:25–36 [PMID: 16814730 DOI: 10.1016/j.cmet.2006.04.015]
97. You S, Wood P a, Xiong Y, Kobayashi M, Du-Quiton J, Hrushesky WJM. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression. *Breast Cancer Res Treat* 2005;**91**:47–60 [PMID: 15868431 DOI: 10.1007/s10549-004-6603-z]
98. Charles KA, Rivory LP, Brown SL, Liddle C, Clarke SJ, Robertson GR. Transcriptional repression of hepatic Cytochrome P450 3A4 gene in the presence of cancer. *Clin Cancer Res* 2006;**12**:7492–7 [PMID: 17189422 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0023]
99. Morgan ET, Goralski KB, Piquette-miller M, Renton KW, Robertson GR, Chaluvadi MR, Charles K a, Clarke SJ, Kacevska M, Liddle C, Richardson T, Sharma R, Sinal C. Regulation of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in Infection, Inflammation, and Cancer. *Drug Metab Dispos* 2008;**36**:205–16 [PMID: 18218849 DOI: 10.1124/dmd.107.018747]
100. Filipski E, Subramanian P, Carriere J, Guettier C, Barbason H, Levi F. Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2009;**680**:95–105 [PMID: 19833225 DOI: 10.1016/j.mrgentox.2009.10.002]
101. Mormont MC, Lévi F. Circadian-system alterations during cancer processes: a review. *Int J cancer* 1997;**70**:241–7 [PMID: 9009166]
102. Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2006;**6**:947–60 [PMID: 17128211 DOI: 10.1038/nrc2015]
103. Bièche I, Girault I, Urbain E, Tozlu S, Lidereau R. Relationship between intratumoral expression of genes coding for xenobiotic-metabolizing enzymes and benefit from adjuvant tamoxifen in estrogen receptor alpha-positive postmenopausal breast carcinoma. *Breast Cancer Res* 2004;**6**:R252-63 [PMID: 15084249 DOI: 10.1186/bcr784]
104. Singh MS, Michael M. Role of Xenobiotic Metabolic Enzymes in Cancer Epidemiology. *Cancer Epidemiol* 2009;**472** [PMID: 19107436 DOI: 10.1007/978-1-60327-492-0\_10]
105. Masood N, Malik FA, Kayani MA. Expression of xenobiotic metabolizing genes in head and neck cancer tissues. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;**12**:377–82 [PMID: 21545198]
106. Lee S, Donehower L a, Herron AJ, Moore DD, Fu L. Disrupting circadian

- homeostasis of sympathetic signaling promotes tumor development in mice. *PLoS One* 2010;**5**:e10995 [PMID: 20539819 DOI: 10.1371/journal.pone.0010995]
107. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene *Period2* plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 2002;**111**:41–50 [PMID: 12372299 DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00961-3]
  108. Mteyrek A, Filipinski E, Guettier C, Okyar A, Lévi F. Clock gene *Per2* as a controller of liver carcinogenesis. *Oncotarget* 2016;[PMID: 27494874 DOI: 10.18632/oncotarget.11037]
  109. Sun C, Huang S, Zeng J, Liu D, Xiao Q, Tian W, Zhu X, Huang Z, Feng W. *Per2* inhibits k562 leukemia cell growth in vitro and in vivo through cell cycle arrest and apoptosis induction. *Pathol Oncol Res* 2010;**16**:403–11 [PMID: 19957060 DOI: 10.1007/s12253-009-9227-0]
  110. Gery S, Komatsu N, Baldjyan L, Yu A, Koo D, Koeffler HP. The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol Cell* 2006;**22**:375–82 [PMID: 16678109 DOI: 10.1016/j.molcel.2006.03.038]
  111. Wood P a, Yang X, Taber A, Oh E-Y, Ansell C, Ayers SE, Al-Assaad Z, Carnevale K, Berger FG, Peña MMO, Hrushesky WJM. *Period 2* mutation accelerates *ApcMin/+* tumorigenesis. *Mol cancer Res* 2008;**6**:1786–93 [PMID: 19010825 DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0196]
  112. Cotignola J, Leonardi DB, Shahabi A, Acuña a D, Stern MC, Navone N, Scorticati C, De Siervi A, Mazza O, Vazquez E. Glutathione-S-transferase (GST) polymorphisms are associated with relapse after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2012;1–7 [PMID: 23146971 DOI: 10.1038/pcan.2012.45]
  113. StataCorp. Stata Statistical Software: Release 11. 2009;
  114. Epidat: programa para análisis epidemiológico de datos. Versión 4.0.
  115. Peakall R, P.E. S. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 2012;**28**:2537–9 [PMID: 22820204 DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460]
  116. Karantanos T, Theodoropoulos G, Gazouli M, Vaiopoulou A, Karantanou C, Stravopodis DJ, Bramis K, Lymperi M, Pektasidis D. Association of the clock genes polymorphisms with colorectal cancer susceptibility. *J Surg Oncol* 2013;**108**:563–7 [PMID: 24037774 DOI: 10.1002/jso.23434]
  117. Geng P, Ou J, Li J, Wang N, Xie G, Sa R, Liu C, Xiang L, Liang H. Genetic Association Between *PER3* Genetic Polymorphisms and Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015;**94**:e568 [PMID: 25837749 DOI: 10.1097/MD.0000000000000568]
  118. Alexander M, Burch JB, Steck SE, Chen CF, Hurley TG, Cavicchia P, Ray M, Shivappa N, Guess J, Zhang H, Youngstedt SD, Creek KE, Lloyd S, Yang X, Hébert JR. Case-control study of the *PERIOD3* clock gene length polymorphism and colorectal adenoma formation. *Oncol Rep* 2015;**33**:935–41 [PMID: 25501848 DOI: 10.3892/or.2014.3667]

119. Pati AK, Parganiha A, Kar A, Soni R, Roy S, Choudhary V. Alterations of the Characteristics of the Circadian Rest-Activity Rhythm of Cancer In-Patients. *Chronobiol Int* 2007;**24**:1179–97 [PMID: 18075806 DOI: 10.1080/07420520701800868]
120. Parker K, Bliwise D, Ribeiro M, Jain S, Vena C, Kohles-Baker M, Rogatko A, Xu Z, Harris W. Sleep/Wake patterns of individuals with advanced cancer measured by ambulatory polysomnography. *J Clin Oncol* 2008;**26**:2464–72 [PMID: 18487566 DOI: 10.1200/JCO.2007.12.2135]
121. Eismann E, Lush E, Sephton SE. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways. *Psychoneuroendocrinology* 2010;**35**:963–76 [PMID: 20097011 DOI: 10.1016/j.psyneuen.2009.12.011]
122. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night Shift Work, Light at Night, and Risk of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;**93**:1557–62 [PMID: 11604479 DOI: 10.1093/jnci/93.20.1557]
123. Blanco M, Kriber N, Cardinali DP. Encuesta sobre dificultades del sueño en una población urbana latinoamericana. *Rev Neurol* 2004;**39**:115–9 [PMID: 15264159]
124. Roenneberg T, Kantermann T, Juda M, Vetter C, Allebrandt K V. Light and the human circadian clock. *Handb Exp Pharmacol* 2013;**217**:311–31 [PMID: 23604485 DOI: 10.1007/978-3-642-25950-0\_13]
125. Wittmann M, Dinich J, Merrow M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int* 2006;**23**:497–509 [PMID: 16687322 DOI: 10.1080/07420520500545979]
126. Voinescu BI, Coogan AN. A variable-number tandem repeat polymorphism in PER3 is not associated with chronotype in a population with self-reported sleep problems. *Sleep Biol Rhythms* 2012;**10**:23–6 [DOI: 10.1111/j.1479-8425.2011.00514.x]
127. Viola AU, Archer SN, James LM, Groeger J, Lo JCY, Skene DJ, von Schantz M, Dijk D-J. PER3 polymorphism predicts sleep structure and waking performance. *Curr Biol* 2007;**17**:613–8 [PMID: 17346965 DOI: 10.1016/j.cub.2007.01.073]
128. Dijk D-J, Archer SN. PERIOD3, circadian phenotypes, and sleep homeostasis. *Sleep Med Rev* 2010;**14**:151–60 [PMID: 19716732 DOI: 10.1016/j.smrv.2009.07.002]
129. Costa G, Haus E, Stevens R. Shift work and cancer - considerations on rationale, mechanisms, and epidemiology. *Scand J Work Environ Health* 2010;**36**:163–79 [PMID: 20126969]
130. He X, Wei W, Liu Z, Shen X, Yang X, Wang S, Xie D. Association between the CYP1A1 T3801C polymorphism and risk of cancer: Evidence from 268 case-control studies. *Gene* 2014;**534**:324–44 [PMID: 24498651 DOI: 10.1016/j.gene.2013.10.025]
131. Sopori ML, Kozak W. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol* 1998;**83**:148–56 [PMID: 9610683 DOI: 10.1016/S0165-5728(97)00231-2]

132. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:733–44 [PMID: 14570033 DOI: 10.1038/nrc1190]
133. Bracci PM, Holly E. Tobacco use and non-Hodgkin lymphoma: results from a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *Cancer Causes Control* 2005;**16**:333–46 [PMID: 15953976 DOI: 10.1007/s10552-004-4324-6]
134. Schöllkopf C, Smedby KE, Hjalgrim H, Ekstro K, Rostgaard K, Gadeberg O, Adami H, Melbye M. Cigarette Smoking and Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma – A Population-Based Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:1791–6 [PMID: 16030118 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0077]
135. Parodi S, Santi I, Marani E, Fontana V, Stagnaro E. Lifestyle factors and risk of leukemia and non-Hodgkin's lymphoma: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2016;**27**:367–75 [PMID: 26759332 DOI: 10.1007/s10552-016-0713-x]
136. Björk J, Johansson B, Broberg K, Albin M. Smoking as a risk factor for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia and its relation to cytogenetic findings: a case-control study. *Leuk Res* 2009;**33**:788–91 [PMID: 19019430 DOI: 10.1016/j.leukres.2008.10.009]
137. Fernberg P, Odenbro A, Bellocco R, Boffetta P, Pawitan Y, Zendehdel K, Adami J. Tobacco use, body mass index, and the risk of leukemia and multiple myeloma: a nationwide cohort study in Sweden. *Cancer Res* 2007;**67**:5983–6 [PMID: 17575169 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0274]
138. Balasubramaniam G, Saoba SL, Sarhade MN. Lifestyle Factors Including Diet and Leukemia Development: a Case-Control Study from Mumbai, India. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015;**14**:5657–61 [PMID: 24289558 DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.10.5657]
139. Ma X, Park Y, Mayne ST, Wang R, Sinha R, Hollenbeck AR, Schatzkin A, Cross AJ. Diet, Lifestyle, and Acute Myeloid Leukemia in the NIH-AARP Cohort. *Am J Epidemiol* 2010;**171**:312–22 [PMID: 20042434 DOI: 10.1093/aje/kwp371]
140. Fircanis S, Merriam P, Khan N, Castillo J. The relation between cigarette smoking and risk of acute myeloid leukemia: An updated meta-analysis of epidemiological studies. *Am J Hematol* 2014;**89**:125–32 [PMID: 24753145 DOI: 10.1002/ajh.23744]
141. Rubinstein AL, Irazola VE, Calandrelli M, Elorriaga N, Gutierrez L, Lanas F, Manfredi JA, Mores N, Olivera H, Poggio R, Ponzio J, Seron P, Chen C, Bazzano LA, He J. Multiple cardiometabolic risk factors in the Southern Cone of Latin America: A population-based study in Argentina, Chile, and Uruguay. *Int J Cardiol* 2015;**183**:82–8 [PMID: 25662056 DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.01.062]
142. Schargrodsky H, Pramparo P, Boissonnet C, Champagne BM, Sebrie EM. Tobacco smoking in seven Latin American cities: the CARMELA study. *Tob Control* 2010;**1**–6 [PMID: 20709777 DOI: 10.1136/tc.2009.031666]
143. Fitzgibbon M, Stolley M, Tussing-Humphreys L. Diet and Cancer. En: Holland JC, Breitbart WS, Jacobsen PB, Loscalzo MJ, McCorkle R, Butow PN. *Psycho-Oncology*. Oxford University Press; 2015. página 864

144. Bouvard V, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Ghissassi F El, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Mattock H, Straif K. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncol* 2015;**16**:1599–600 [PMID: 26514947 DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00444-1]
145. Pou SA, Niclis C, Eynard AR, Díaz M del P. Dietary patterns and risk of urinary tract tumors: a multilevel analysis of individuals in rural and urban contexts. *Eur J Nutr* 2014;**53**:1247–53 [PMID: 24292744 DOI: 10.1007/s00394-013-0627-2]
146. Navarro A, Mun SE, Diaz P, Cristaldo PE, Eynard AR. Meat Cooking Habits and Risk of Colorectal Cancer in Córdoba, Argentina. *Nutrition* 2004;**20**:873–7 [PMID: 15474875 DOI: 10.1016/j.nut.2004.06.008]
147. Pou SA, Díaz M del P, Osella AR. Applying multilevel model to the relationship of dietary patterns and colorectal cancer: an ongoing case-control study in Córdoba, Argentina. *Eur J Nutr* 2012;**51**:755–64 [PMID: 21990003 DOI: 10.1007/s00394-011-0255-7]
148. Niclis C, Román MD, Osella AR, Eynard AR, Díaz P. Traditional Dietary Pattern Increases Risk of Prostate Cancer in Argentina: Results of a Multilevel Modeling and Bias Analysis from a Case-Control Study. *J Cancer Epidemiol* 2015; [PMID: 26649040 DOI: 10.1155/2015/179562]
149. Román MD, Niclis C, Tumas N, Díaz P, Osella AR, Muñoz SE. Tobacco smoking patterns and differential food effects on prostate and breast cancers among smokers and nonsmokers in Córdoba, Argentina. *Eur J Cancer Prev* 2012;**23**:310–8 [PMID: 24871563 DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000044]
150. Tumas N, Niclis C, Aballay LR, Di P. Traditional dietary pattern of South America is linked to breast cancer: an ongoing case-control study in Argentina. *Eur J Nutr* 2014;**53**:557–66 [PMID: 23907208 DOI: 10.1007/s00394-013-0564-0]
151. De Stefani E, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Boffetta P, Aune D, Mendilaharsu M, Acosta G, Silva C, Landó G, Luaces ME. Meat Consumption, Cooking Methods, Mutagens, and Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: A Case-Control Study in Uruguay. *Nutr Cancer* 2012;**64**:294–9 [PMID: 22242927 DOI: 10.1080/01635581.2012.648299]
152. Chang E, Smedby K, Zhang S, Hjalgrim H, Melbye M, Ost A, Glimelius B, Wolk A, Adami H. Dietary Factors and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in Men and Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:512–20 [PMID: 15734980 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0451]
153. Kabat GC, Wu JW, Moore SC. Lifestyle and Dietary Factors in Relation to Risk of Chronic Myeloid Leukemia in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;**22**:848–54 [PMID: 23625904 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0093]
154. Talamini R, Polesel J, Montella M, Dal Maso L, Crovatto M, Crispo A, Spina M, Canzonieri V, La Vecchia C, Franceschi S. Food groups and risk of non-Hodgkin lymphoma: a multicenter, case-control study in Italy. *Int J Cancer* 2006;**118**:2871–6 [PMID: 16385566 DOI: 10.1002/ijc.21737]
155. Li Y, Moysich KB, Baer MR, Weiss JR, Brasure J, Graham S, McCann SE. Intakes of selected food groups and beverages and adult acute myeloid

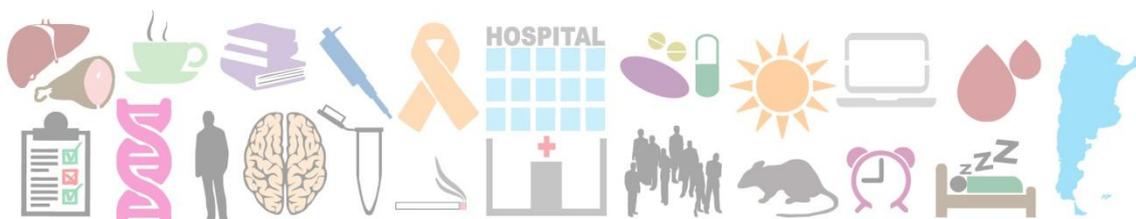
- leukemia. *Leuk Res* 2006;**30**:1507–15 [PMID: 16678899 DOI: 10.1016/j.leukres.2006.03.017]
156. Diaz L, Montero A, Gonzalez-Gross M, et al. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Eur J Clin Nutr* 2002;**56**:S50-3 [PMID: 12142963 DOI: 10.1038/sj.ejcn.1601486]
157. Cross AJ, Lim U. The role of dietary factors in the epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2006;**47**:2477–87 [PMID: 17169793 DOI: 10.1080/10428190600932927]
158. Rota M, Porta L, Pelucchi C, Negri E, Bagnardi V, Bellocco R, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C. Alcohol drinking and multiple myeloma risk – a systematic review and meta-analysis of the dose – risk relationship. *Eur J Cancer Prev* 2014;**23**:113–21 [PMID: 24469244 DOI: 10.1097/CEJ.0000000000000001]
159. Rota M, Porta L, Pelucchi C, Negri E, Bagnardi V, Bellocco R, Corrao G, Boffetta P, La Vecchia C. Alcohol drinking and risk of leukemia — A systematic review and meta-analysis of the dose – risk relation. *Cancer Epidemiol* 2014;**38**:339–45 [PMID: 24986108 DOI: 10.1016/j.canep.2014.06.001]
160. Scalbert A, Manach C, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005;**45**:287–306 [PMID: 16047496 DOI: 10.1080/1040869059096]
161. Hashibe M, Galeone C, Buys SS, Gren L, Boffetta P, Zhang Z. Coffee, tea, caffeine intake, and the risk of cancer in the PLCO cohort. *Br J Cancer* 2015;**113**:809–16 [PMID: 26291054 DOI: 10.1038/bjc.2015.276]
162. Larsson SC, Wolk A. Coffee consumption and risk of liver cancer: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2007;**132**:1740–5 [PMID: 17484871 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.03.044]
163. Je Y, Liu W, Giovannucci E. Coffee consumption and risk of colorectal cancer: A systematic review and metaanalysis of prospective cohort studies. *Int J Cancer* 2009;**124**:1662–8 [PMID: 19115212 DOI: 10.1002/ijc.24124]
164. Tang N, Zhou B, Wang B, Yu R. Coffee consumption and risk of breast cancer: a metaanalysis. *Am J Obs Gynecol* 2009;**200**:290.e1-290.e9 [PMID: 19114275 DOI: 10.1016/j.ajog.2008.10.019]
165. Bravi F, Scotti L, Bosetti C, Gallus S, Negri E, La Vecchia C, Tavani A. Coffee drinking and endometrial cancer risk: a metaanalysis of observational studies. *Am J Obs Gynecol* 2009;**200**:130–5 [PMID: 19110217 DOI: 10.1016/j.ajog.2008.10.032]
166. Franceschi S, Serraino D, Carbone A, Talamini R, Vecchia C La. Dietary factors and non-Hodgkin's lymphoma: A case-control study in the northeastern part of Italy. *Nutr Cancer* 1989;**12**:333–41 [PMID: 2608538 DOI: 10.1080/01635588909514034]
167. Zhang SM, Hjalgrim H, Chang ET, Ekstro K. Dietary Factors and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in Men and Women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:512–20 [PMID: 15734980 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0451]

168. Tavani A, Negri E, Franceschi S, Talamini R, La Vecchia C. Coffee consumption and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Cancer Prev* 1994;**3**:351–6 [PMID: 7950889]
169. Matsuo K, Hamajima N, Hirose K, Inoue M, Takezaki T, Kuroishi T, Tajima K. Alcohol, Smoking, and Dietary Status and Susceptibility to Malignant Lymphoma in Japan: Results of a Hospital-based Case-control Study at Aichi Cancer Center. *Japanese J cancer Res* 2001;**92**:1011–7 [PMID: 11676850 DOI: 10.1111/j.1349-7006.2001.tb01054.x]
170. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for IARC Monographs during 2015 – 2019. 2014.
171. Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, Lauby-Secretan B, Ghissassi F El, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Mattock H, Straif K. Carcinogenicity of drinking coffee, mate, and very hot beverages. *Lancet Oncol* 2016;**17**:877–8 [PMID: 27318851 DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30239-X]
172. He H, You H, Sun J, Hu S, Ma Y, Dong Y, Lu J. Glutathione S-transferase Gene Polymorphisms and Susceptibility to Acute Myeloid Leukemia: Meta-analyses. *Jpn J Clin Oncol* 2014;**44**:1070–81 [PMID: 25145382 DOI: 10.1093/jjco/hyu121]
173. Voso MT, D'Aló F, Gumiero D, Guidi F, Hohaus S, Leone G. The CYP1A1\*2a allele is an independent prognostic factor for acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2005;**90**:982–4 [PMID: 15996939]
174. Ansell PJ, Espinosa-Nicholas C, Curran EM, Judy BM, Philips BJ, Hannink M, Lubahn DB. In vitro and in vivo regulation of antioxidant response element-dependent gene expression by estrogens. *Endocrinology* 2004;**145**:311–7 [PMID: 14551226 DOI: 10.1210/en.2003-0817]
175. Garte S, Gaspari L, Alexandrie a K, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Benhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, Brockmoller J, Cascorbi I, Clapper ML, Coutelle C, Daly A, Dell'Omo M, Dolzan V, Dresler CM, Fryer A, Haugen A, Hein DW, Hildesheim A, Hirvonen A, Hsieh LL, Ingelman-Sundberg M, Kalina I, Kang D, Kihara M, Kiyohara C, Kremers P, Lazarus P, Le Marchand L, Lechner MC, van Lieshout EM, London S, Manni JJ, Maugard CM, Morita S, Nazar-Stewart V, Noda K, Oda Y, Parl FF, Pastorelli R, Persson I, Peters WH, Rannug A, Rebbeck T, Risch A, Roelandt L, Romkes M, Ryberg D, Salagovic J, Schoket B, Seidegard J, Shields PG, Sim E, Sinnet D, Strange RC, Stücker I, Sugimura H, To-Figueras J, Vineis P, Yu MC, Taioli E. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev* 2001;**10**:1239–48 [PMID: 11751440]
176. Roco Á, Quiñones L, Agúndez JAG, García-Martín E, Squicciarini V, Miranda C, Garay J, Farfán N, Saavedra I, Cáceres D, Ibarra C, Varela N. Frequencies of 23 functionally significant variant alleles related with metabolism of antineoplastic drugs in the chilean population: Comparison with caucasian and asian populations. *Front Genet* 2012;**3**:1–9 [PMID: 23130019 DOI: 10.3389/fgene.2012.00229]
177. Han F, Tan Y, Cui W, Dong L, Li W. Novel Insights Into Etiologies of Leukemia: A HuGE Review and Meta-Analysis of CYP1A1 Polymorphisms and Leukemia Risk. *Am J Epidemiol* 2013;**178**:493–507 [PMID: 23707957 DOI: 10.1093/aje/kws400]

- 10.1093/aje/kwt016]
178. Lu J, Zhao Q, Zhai Y-J, He H-R, Yang L-H, Gao F, Zhou R-S, Zheng J, Ma X-C. Genetic polymorphisms of CYP1A1 and risk of leukemia: a meta-analysis. *Oncotargets Ther* 2015;**8**:2883–902 [PMID: 26491362 DOI: 10.2147/OTT.S92259]
  179. Zhuo W, Zhang L, Wang Y, Zhu B, Chen Z. CYP1A1 MspI polymorphism and acute myeloid leukemia risk: meta-analyses based on 5018 subjects. *J Exp Clin cancer Res* 2012;**31**:62 [PMID: 22846179 DOI: 10.1186/1756-9966-31-62]
  180. Moore LE, Wiencke JK, Bates MN, Zheng S, Rey O a, Smith AH. Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case-control study in Argentina. *Cancer Lett* 2004;**211**:199–207 [PMID: 15219943 DOI: 10.1016/j.canlet.2004.04.011]
  181. Weich N, Nuñez MC, Galimberti G, Elena G, Acevedo S, Larripa I, Fundia AF. GSTP1 genes in childhood acute leukemias: A preliminary study in Argentina. *Hematology* 2015;**20**:511–6 [PMID: 25799091 DOI: 10.1179/1607845415Y.0000000007]
  182. Porcel de Peralta M, Scagnetti J, Grigolato R, Sylvestre J, Kleinsorge E, Simoniello M. Evaluación del daño oxidativo al ADN y efecto de la susceptibilidad genética en una población laboral y ambientalmente expuesta a mezclas de plaguicidas. *Rev FABICIB* 2011;**15**:119–29 [DOI: 10.14409/fabicib.v15i1.886]
  183. Bailliet G, Santos MR, Alfaro EL, Dipierri JE, Demarchi D a, Carnese FR, Bianchi NO. Allele and genotype frequencies of metabolic genes in Native Americans from Argentina and Paraguay. *Mutat Res* 2007;**627**:171–7 [PMID: 17194620 DOI: 10.1016/j.mrgentox.2006.11.005]
  184. Lima C, Lourenço G, Angelo S, Honma H, Silva E, Nascimento H, Cardoso-Filho C, Ortega M, AF S, Costa F. An analysis of the GST genetic polymorphism in cancer risk in Southeastern Brazil. *J Clin Oncol* 2008;**26** [PMID: 21637410 DOI: 10.1590/S1415-47572010000300007]
  185. Al-Achkar W, Azeiz G, Moassass F, Wafa A. Influence of CYP1A1, GST polymorphisms and susceptibility risk of chronic myeloid leukemia in Syrian population. *Med Oncol* 2014;**31** [PMID: 24671854 DOI: 10.1007/s12032-014-0889-4]
  186. Bajpai P, Tripathi AK, Agrawal D. Increased frequencies of glutathione-S-transferase (GSTM1 and GSTT1) null genotypes in Indian patients with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 2007;**31**:1359–63 [PMID: 17420047 DOI: 10.1016/j.leukres.2007.02.003]
  187. Kassogue Y, Dehbi H, Quachouh M, Quessar A, Benchekroun S, Nadifi S. Association of glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) genes with chronic myeloid leukemia. *Springerplus* 2015;**4** [PMID: 25969820 DOI: 10.1186/s40064-015-0966-y]
  188. Tsabouri S, Georgiou I, Katsaraki A, Lambros K. Glutathione sulfur transferase M1 and T1 genotypes in chronic lymphoblastic leukemia. *Hematol J* 2004;**5**:500–4 [PMID: 15570292 DOI: 10.1038/sj.thj.6200555]

189. Zhou L, Zhu Y, Zhang X, Li Y, Liu Z. Risk Effects of GST Gene Polymorphisms in Patients with Acute Myeloid Leukemia: A Prospective Study. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;**14**:3861–4 [PMID: 23886197 DOI: 10.7314/APJCP.2013.14.6.3861]
190. Zi YM, Wu S, Ma D, Yang C, Yang M, Huang Y, Yang SJ. Association of GSTTI and GSTM1 variants with acute myeloid leukemia risk. *Genet Mol Res* 2014;**13**:3681–5 [PMID: 24854448 DOI: 10.4238/2014.May.9.11]
191. Chauhan PS, Ihsan R, Yadav DS, Mishra AK, Bhushan B, Soni A, Kaushal M, Devi TR, Saluja S, Gupta DK, Mittal V, Saxena S, Kapur S. Association of glutathione S-transferase, EPHX, and p53 codon 72 gene polymorphisms with adult acute myeloid leukemia. *DNA Cell Biol* 2011;**30**:39–46 [PMID: 20731606 DOI: 10.1089/dna.2010.1092]
192. Ortega MM, Honma HN, Zambon L, Lorand-Metze I, Costa FF, De Souza C a, Lima CSP. GSTM1 and codon 72 P53 polymorphism in multiple myeloma. *Ann Hematol* 2007;**86**:815–9 [PMID: 17653713 DOI: 10.1007/s00277-007-0347-x]
193. Chen H-C, Hu W-X, Liu Q-X, Li W-K, Chen F-Z, Rao Z-Z, Liu X-F, Luo Y-P, Cao Y-F. Genetic polymorphisms of metabolic enzymes CYP1A1, CYP2D6, GSTM1 and GSTT1 and leukemia susceptibility. *Eur J Cancer Prev* 2008;**17**:251–8 [PMID: 18414197 DOI: 10.1097/CEJ.0b013e3282b72093]
194. Banescu C, Trifa AP, Voidazan S, Moldovan VG, Macarie I, Lazar EB, Dima D, Duicu C, Dobreanu M. CAT, GPX1, MnSOD, GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Genetic Polymorphisms in Chronic Myeloid Leukemia: A Case-Control Study. *Oxid Med Cell Longev* 2014; [PMID: 25436036 DOI: 10.1155/2014/875861]
195. Gra OA, Glotov AS, Nikitin EA, Glotov OS, Kuznetsova VE, Chudinov A V, Sudarikov AB, Nasedkina T V. Polymorphisms in xenobiotic-metabolizing genes and the risk of chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin ' s lymphoma in adult Russian patients. *Am J Hematol* 2008;**83**:279–87 [PMID: 18061941 DOI: 10.1002/ajh.21113]
196. Aydin-Sayitogiu M, Hatimaz O, Erensoy N, Ozbek U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. *Am J Hematol* 2006;**81**:162–70 [PMID: 16493615 DOI: 10.1002/ajh.20434]
197. San Miguel JF, Sanches-Guijo Martín F. Hematología: Manual Básico Razonado. 4ta ed. Barcelona: Elsevier España; 2015.
198. Relling M V, Giacomini KM. Pharmacogenetics. En: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York: McGraw-Hill; 2005. página 93–115
199. Lévi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J. Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;**50**:377–421 [PMID: 20055686 DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094626]

## ANEXO



**HOJA DE INFORMACIÓN Y FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO  
PARA EL PARTICIPANTE**

**GENES METABOLIZANTES XENOBIÓTICOS Y GENES RELOJ: UN ENFOQUE  
MOLECULAR HACIA LA CRONOFARMACOLOGÍA DEL CÁNCER**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** LIC. MARÍA BELÉN CERLIANI  
**INSTITUCIÓN:** INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE  
BIOLOGÍA CELULAR  
(CIC – CONICET)  
Calle 526 y Camino General Belgrano – La  
Plata

**INFORMACIÓN GENERAL:** Por la presente se lo invita a Ud. a participar libre y voluntariamente del estudio de investigación “*Genes Metabolizantes Xenobióticos y Genes Reloj: un enfoque molecular hacia la Cronofarmacología del Cáncer*”, desarrollado en el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, CIC-CONICET).

Antes de firmar el consentimiento informado, usted debe LEER y COMPRENDER la explicación sobre los objetivos, procedimientos e implicancias de la investigación mencionada.

**INTRODUCCIÓN:** soy la Lic. María Belén Cerliani y estoy desarrollando un trabajo de investigación en la Unidad de Investigación de Citogenética y Mutagénesis del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) sobre: “**Genes Metabolizantes Xenobióticos y Genes Reloj: un enfoque molecular hacia la cronofarmacología del cáncer**”. Antes de decidirse, puede hablar con alguien con quien se sienta cómodo sobre la investigación que se va a desarrollar. Puede que haya algunas palabras que no entienda, por lo tanto le pido que por favor me interrumpa y le explicaré nuevamente. Si tiene preguntas más tarde, puede preguntarme a mí o a los demás miembros del equipo.

**PROPÓSITO:** Nuestro reloj biológico, denominado “*reloj circadiano*”, modula numerosos procesos biológicos durante las 24 horas del día, generando ritmos en la fisiología y el comportamiento de nuestro cuerpo. El reloj circadiano está determinado genéticamente y es tan importante, que todos los demás seres vivos también presentan algún tipo de reloj. Unos pocos genes que participan en su funcionamiento (denominados “*genes reloj*”) controlan a muchos otros, que se denominan en conjunto “*genes controlados por el reloj*”. Éstos últimos, participan en funciones vitales como el control del crecimiento celular, la muerte celular y la respuesta frente al daño en el

material genético (en el ADN). Por lo tanto, el reloj circadiano estaría jugando un rol importante en el desarrollo y la progresión del cáncer.

Así como el reloj controla el sueño y la vigilia, la temperatura de nuestro cuerpo y la producción de varias hormonas, también regula el metabolismo de los fármacos que consumimos y de los compuestos tóxicos (que podrían causarnos cáncer). El procesamiento de todas estas sustancias está a cargo de las *enzimas metabolizantes de xenobióticos* (EMX), que se encuentran principalmente en el hígado, y en menor medida en todos los tejidos del cuerpo. Las EMX están codificadas por los *genes metabolizantes de xenobióticos* (GMX).

A partir de lo mencionado en los párrafos anteriores, se desprende que los genes reloj y los GMX están en estrecha relación con procesos celulares básicos, como el control del crecimiento y la muerte celular, el metabolismo de sustancias procarcinógenas y drogas, y la respuesta de las células frente al daño ocasionado por estas sustancias. En los últimos años, numerosos trabajos de investigación han reportado un aumento en el riesgo de cáncer asociado a variaciones (cambios en el ADN) en los genes reloj y en los GMX. También se informaron diferencias en los niveles de expresión de estos genes en los tejidos tumorales, cuando se los compara con tejidos sanos.

El objetivo de este estudio es comenzar la elaboración de un perfil cronofarmacogenético del cáncer, es decir, caracterizar la enfermedad desde el punto de vista cronobiológico dado por los genes reloj, y desde la farmacogenética dada por los GMX, aumentando así el conocimiento disponible para mejorar los tratamientos oncológicos. Para alcanzar este objetivo, se evaluarán las diferencias en el ADN y en los niveles de expresión de los genes reloj y los GMX, utilizando para ello: a) muestras de pacientes oncológicos, b) muestras de pacientes sanos, c) series de muestras obtenidas a lo largo de un día de pacientes bajo tratamiento oncológico.

El objetivo a largo plazo implica la utilización de los conocimientos disponibles para ajustar el tratamiento al paciente, indicando el fármaco correspondiente, la dosis a usar y el momento del día ideal para su administración, obteniendo así una mejor eficacia y disminuyendo los efectos adversos.

**TIPO DE INTERVENCIÓN Y PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:** lo estamos invitando a participar de este estudio y en el caso que usted decida su participación, la Investigadora Principal y el equipo de Investigación procederán de la siguiente manera.

- a) Si a usted se le ha diagnosticado leucemia, se le tomará una muestra de sangre (aproximadamente 10 ml, mediante punción en vena periférica) o una muestra de mucosa bucal (cepillando la cara interna de sus mejillas). No es necesario que usted haya pasado por alguna línea de tratamiento contra la enfermedad.
- b) Si usted concurre a su médico en carácter de paciente sano, con el fin de realizarse un control de salud, o concurre por otro motivo no relacionado al cáncer, se le tomará una muestra de sangre (aproximadamente 10 ml, mediante punción en vena periférica). Su muestra servirá de control frente a las muestras tumorales.

- c) Si usted está internado, recibiendo tratamiento contra la leucemia, se le tomará una serie de muestras de sangre o mucosa bucal (cepillando la cara interna de sus mejillas), a intervalos de 6/8 horas durante un día completo (8 hs., 16 hs. y 24 hs.). Esta serie de muestras se utilizará para medir niveles de expresión de genes reloj y GMX a lo largo del día.

Todas las muestras serán tomadas por personal de la Unidad de Diagnóstico, Tratamiento y Sostén de Enfermedades Hemáticas - UTMO del Hospital Prof. Dr. Rodolfo Rossi. Una vez acondicionadas para su correcto transporte, las muestras se trasladarán al Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE, donde se continuará con los protocolos de laboratorio establecidos, según los objetivos de esta investigación.

En todos los casos, se realizará una entrevista clínica con usted. Si fuera necesario repetir la toma de muestras, usted será notificado. Todas las muestras serán manejadas y analizadas únicamente por personas involucradas directamente en este proyecto, y almacenadas en los freezers con que cuenta el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis del IMBICE, a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ . Durante el estudio se utilizará parte de la muestra obtenida, conservando el resto como "resguardo" en caso que existieran problemas durante el procesamiento de la muestra principal. El conjunto de las muestras serán acondicionadas para su almacenamiento a largo plazo, y podrán ser utilizadas en futuras líneas de investigación de la Unidad de Citogenética y Mutagénesis, siempre referidas al estudio del cáncer a nivel molecular, sus posibles factores de riesgo -ambientales y genéticos- e implicancias para el tratamiento. Las muestras de aquellos pacientes que deseen retirarse del estudio se destruirán mediante su depósito en contenedores específicos para residuos patológicos, que luego serán incinerados.

**CUÁLES SON LOS POSIBLES RIESGOS AL PARTICIPAR DEL ESTUDIO:** La participación como voluntario en este estudio no implica ningún riesgo para su salud e integridad. Las molestias y efectos adversos estarán representados exclusivamente por la toma de la muestra de sangre periférica referida en el procedimiento, cuyas molestias pueden ser: hematomas, enrojecimiento y/o sensibilidad al tacto en el lugar de donde se extrae la muestra; sin embargo, éstas serán de manera transitoria. La toma de muestras de mucosa bucal mediante hisopado no conlleva ningún riesgo para su salud.

En el caso de presentarse alguna de estas complicaciones usted puede contactarse directamente con la Investigadora Principal, al T.E. 0221 15 607 0521 o a la Unidad de Investigación de Citogenética y Mutagénesis del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) 0221 421 0112, durante las 24 hs del día.

**CUÁLES SON LOS POSIBLES BENEFICIOS DE PARTICIPAR DEL ESTUDIO:** No existe ningún beneficio directo para usted por participar en la investigación. Sin embargo, este estudio puede contribuir a dilucidar las relaciones existentes entre el reloj circadiano, los GMX y el desarrollo tumoral, aumentando así el conocimiento disponible para mejorar los tratamientos oncológicos.

Usted no percibirá ningún beneficio económico por participar de este estudio.

**ES OBLIGATORIA MI PARTICIPACIÓN:** No es obligatoria su participación en el presente estudio. La decisión de participar en la investigación depende solo de usted, y esto no modificará en nada la conducta terapéutica ni su calidad como paciente. Usted recibirá el mismo tratamiento y cuidado que se les brindan a los demás pacientes, independientemente que haya aceptado participar o no en el estudio que se describe en este documento.

**PUEDO RETIRAR MI CONSENTIMIENTO:** Usted puede retirar en cualquier momento su consentimiento para que se utilice su muestra de tejidos en la investigación. Si usted retira su consentimiento antes de que su muestra sea procesada, la misma será destruida o devuelta a usted inmediatamente informe su decisión. Sin embargo, si el estudio de su muestra ya fue realizado, la Investigadora Principal podrá utilizar los datos obtenidos hasta el momento en el cual usted decida retirarse del estudio; en este caso, se destruirán o devolverán a usted las muestras remanentes del tejido extraído guardadas por seguridad.-

**TENGO DERECHO A CONOCER LOS RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN Y MIS DATOS PERSONALES:** El objetivo de este estudio no es entregarle los resultados de las pruebas. No obstante, los investigadores podrán informarle los resultados de la investigación a su médico en caso que lo consideren necesario y que sean relevantes para la patología que lo afecta. Los investigadores no le informarán ningún resultado, ni a usted, ni a ninguna compañía aseguradora, a sus empleadores, familiares ni a ningún otro médico que no sea su médico tratante.

Usted tiene el derecho de solicitar información sobre cualquier dato personal que el investigador principal y/o equipo de investigación tengan de usted. También tiene el derecho a solicitar que cualquier inexactitud en sus datos personales sea corregida.

Cualquier información derivada directa o indirectamente de esta investigación, así como cualquier publicación resultado de este estudio, serán propiedad únicamente del Investigador Principal y del Centro de Investigación que lleva adelante el proyecto.

**CÓMO SE ASEGURA LA CONFIDENCIALIDAD DE MIS DATOS:** Las muestras extraídas serán identificadas mediante códigos numéricos confidenciales, que permitirán mantener el anonimato del donante durante todo el estudio. En ningún caso será revelada la Identidad Personal del donante. En todo momento, se mantendrán separados los datos de su identidad y los resultados obtenidos. Muy pocas personas están en condiciones de acceder a estos datos, y menos aún de poder relacionarlos. Los médicos tratantes no tendrán acceso a los resultados de la investigación. Como excepción, podrán acceder a sus archivos y conocer su identidad las autoridades regulatorias, quienes son las encargadas de controlar que la investigación se está realizando en forma apropiada y conforme a las leyes y reglamentaciones vigentes a tal fin.

Los resultados de esta investigación tienen como propósito secundario ser publicados en revistas científicas, congresos y reuniones. En las mismas no aparecerán ni su nombre ni ninguna otra información que permita su identificación.

Si ya no quiere compartir su información personal de salud, puede cancelar su permiso en cualquier momento mediante notificación por escrito al Investigador Principal y/o personal del estudio al domicilio que figura en la primera página de este Formulario de Consentimiento Informado. Como indica la ley N° 25.326, usted tiene el derecho de acceder a sus datos en forma gratuita y la posibilidad de rectificarlos. En caso de no poder acceder a los mismos tiene el derecho a hacer la denuncia correspondiente en la Dirección Nacional de Protección de Datos Personales.

La Dirección Nacional de Protección de Datos Personales, Órgano de Control de la Ley N° 25.326, (con domicilio en Sarmiento 1185 – Piso 5 “p” – C1041AAX – Ciudad Autónoma de Buenos Aires – Teléfono (011) 4383-8512/3, correo electrónico: infodnmdp@jus.gov.ar), tiene la atribución de atender las denuncias y reclamos que se interpongan con relación al incumplimiento de las normas sobre protección de datos personales.

El presente trabajo de investigación ha sido evaluado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital Zonal General de Agudos San Roque de Gonnet, inscripto en el Registro Provincial de Comités de Ética en Investigación, dependiente del Comité de Ética Central en Investigación - Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires con fecha 24/09/10, bajo el N° 019/2010, Folio 55, Libro 1°.

Si tiene alguna pregunta relacionada con sus derechos como participante en la investigación puede contactarse con el Comité de Ética en Investigación, del Hospital Zonal General de Agudos San Roque de Gonnet, coordinador Dr. Juan Pablo Von Arx o Dr. Francisco Cañada al teléfono 0221 484 0290 int. 151.

#### **EN CASO DE REQUERIR MAYOR INFORMACIÓN, CONTACTAR A:**

Lic. María Belén Cerliani

Unidad de Investigación:

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis – IMBICE

Calle 526 y Camino Gral. Belgrano s/n – Tolosa, La Plata

Tel.: (0221) 15 607 0521

E-mail: belencerliani@gmail.com

Dra. Silvina Richard

Unidad de Investigación:

Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis – IMBICE

Calle 526 y Camino Gral. Belgrano s/n – Tolosa, La Plata

Tel.: (0221) 421-0112

E-mail: srichard@imbice.gov.ar

**FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA QUE FIRME EL  
PACIENTE**

AUTORIZACIÓN PARA LA TOMA DE MUESTRAS E INCLUSIÓN EN EL PROYECTO  
DE INVESTIGACIÓN:

*“Genes Metabolizantes Xenobióticos y Genes Reloj: un enfoque molecular hacia la  
Cronofarmacología del Cáncer”*

- He leído este formulario de consentimiento informado. También he tenido la oportunidad de discutirlo con la Lic. María Belén Cerliani (o la persona designada para manejar el proceso de consentimiento).
- Me han informado los riesgos y los beneficios. He recibido respuestas que he podido comprender.
- Doy mi consentimiento para que la Lic. María Belén Cerliani obtenga y procese información, inclusive la información sobre mi salud.
- Acepto libremente participar en este estudio.
- Autorizo el acceso directo a mi información personal privada (confidencial) a las siguientes personas:
  - Lic. María Belén Cerliani
  - Personal involucrado en el estudio
  - Comité del Hospital SAN ROQUE de Gonnet
- Entiendo que puedo retirarme de este estudio en cualquier momento. Si me retiro del estudio, mi atención médica futura no se verá afectada. Si decido abandonar el estudio, acepto que siga utilizándose la información que se haya obtenido sobre mí hasta ese momento y que las muestras remanentes sean destruidas.
- No renuncio a ningún derecho legal al firmar este formulario.

Deben firmarse y fecharse dos secciones de firmas originales, como declaración de haber recibido y comprendido la información sobre el ensayo y de haber decidido libre y voluntariamente participar en él.

Cada uno de los abajo firmantes debe completar todos los espacios a mano, en letra de imprenta y sin usar sellos.

Es importante que conserve su original de esta sección de firmas y la copia del documento conteniendo información escrita sobre este ensayo durante el transcurso del estudio.

Al firmar aquí, afirmo que me han dado una copia de este formulario. Guardaré mi copia hasta que finalice mi participación en el estudio.

Firma del Participante      Fecha de la firma      Tipo y N° de identificación (DNI/Otros)

-----

Firma del Padre/Madre o responsable (si aplica)

Fecha de la firma

-----

-----

Nombre

Tipo y N° de identificación

-----

-----

Yo, el abajo firmante, le he explicado completamente al participante mencionado anteriormente la información relevante sobre el estudio de referencia y le proporcionaré una copia de este formulario de consentimiento informado, firmada y fechada.

Nombre de la persona que explicó el  
proceso de consentimiento informado

Firma

-----

-----

Tipo y N° de Identificación

Fecha de la firma

-----

-----

Un testigo deberá estar presente cuando se explique el Consentimiento Informado al Paciente (Requerimiento obligatorio en Provincia de Buenos Aires de acuerdo al Decreto Reglamentario 3385/08 de la Ley 11044). Se recomienda que el testigo sea preferentemente una persona conocida del participante. Si esto no fuera posible, debe estar presente como testigo una persona no relacionada con el centro de investigación.

Confirmando que la información en la hoja de información para la participante y cualquier otra información escrita le ha sido explicada en forma precisa, y ha sido comprendida por la participante y que el consentimiento fue otorgado libremente por parte de la misma.

Nombre del testigo

Firma

-----

-----

Tipo y N° de Identificación

Fecha de la firma

-----

-----

**HOJA DE REGISTRO** N° .....

Fecha: ..... Hospital: .....  
 Nombres: ..... Apellidos: .....  
 Sexo: Masculino  Femenino  Edad: .....  
 Dirección: .....  
 Localidad/municipio: ..... Teléfono: .....  
 Razón por la que concurre a extraerse sangre: .....

**Datos Sociodemográficos:**

Fecha de nacimiento: ..... Localidad, provincia: .....  
 Estado civil actual: Soltero/a  En pareja  Casado/a  Divorciado/a  Viudo/a   
 Hijos: .....  
 Nivel educativo: N/A  Primaria  Secundaria  Terciario  Universitario

**Antecedentes Clínicos:**

Peso actual: ..... Estatura (mts): .....  
 ¿Consumo algún tipo de medicamento actualmente? SI  NO   
 Indique nombre, dosis (si recuerda) y frecuencia de toma: .....  
 .....

**Antecedentes de Hábitos**

¿Alguna vez fumó cigarrillos? SI  NO   
 ¿Durante cuántos años? ..... Cantidad de cigarrillos por día: .....  
 ¿Fuma actualmente? SI  NO  Cantidad de cigarrillos por día: .....  
 En caso de ya no fumar, indique la fecha en la que dejó el hábito: .....

¿Cuántas veces al mes consume carnes asadas?

Nunca	-1	1	2	3	4	5	Más de 5
-------	----	---	---	---	---	---	----------

¿Cuántas veces a la semana consume alimentos en lata (arvejas, jardinera, choclo, atún, etc.)

Nunca	-1	1	2	3	4	5	Más de 5
-------	----	---	---	---	---	---	----------

¿Cuántas tazas de café toma por día?

Ninguna	-1	1	2	3	4	5	Más de 5
---------	----	---	---	---	---	---	----------

¿Cuántas veces al día/por semana consume bebidas alcohólicas? (marcar según la respuesta del entrevistado)

Nunca	1	2	3	4	5	Más de 5 veces <i>al día</i>
Nunca	1	2	3	4	5	6 veces <i>a la semana</i>
<i>Ocasionalmente durante el mes</i>						

**Antecedentes ocupacionales**

Situación ocupacional actual:  
 Empleado  Trabajador por cuenta propia  Trabajador familiar  Patrón  Desempleado   
 Retirado/jubilado/pensionado  Ama de casa  Estudiante

Registro de empleos actuales y anteriores:

<i>Actividad</i>	<i>Horario de trabajo*</i>	<i>Antigüedad en el puesto (desde-hasta)</i>

\* Indicar si trabaja/trabajó de día (mañana/tarde), en sistema de turnos rotativos, turnos nocturnos o guardias con francos.

**Antecedentes Familiares de Cáncer:**

¿Alguno de sus familiares tiene o ha tenido cáncer? SI  NO

Indique quién/quienes: .....

¿Qué tipo de cáncer? .....

**Pacientes oncológicos**

**Historia de la Enfermedad:**

Fecha de Diagnostico: .....

Tipo de cáncer: .....

Tratamiento:

Quimioterapia  Radioterapia  Cirugía  Terapia experimental  Trasplante  Otra

Detalles del tratamiento: .....

.....

.....

.....

.....

**Información sobre funcionalidad: (considerar los últimos meses)**

¿Ha bajado o subido de peso? ¿Cuántos kilos? .....

¿Tiene más o menos apetito que de costumbre, o no nota ningún cambio?.....

¿Cómo se siente de humor? ¿Está tranquilo, contento, alegre, preocupado, enojado, deprimido?.....

¿Cómo siente que está su nivel de energía? ¿Se siente despierto y activo, o cansado, física o mentalmente? .....

.....

¿Duerme bien, sin problemas? .....

¿Tiene problemas para quedarse dormido? SI  NO

¿Se despierta varias veces? SI  NO

¿Se despierta muy temprano en la madrugada? SI  NO

¿Sabe usted si ronca, o alguien le ha dicho que ronca? SI  NO



Comisión de  
Investigaciones Científicas  
Gobierno de la Provincia  
de Buenos Aires

## Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas

Marzo 28, 2012

### Dictamen

**Proyecto:** "Genes Metabolizantes Xenobióticos y Genes Reloj: un enfoque molecular hacia la Cronofarmacología del Cáncer"

**Investigador responsable:** Becaria Lic. Belén Cerliani, Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis, Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, CIC-CONICET)

**Director de beca:** Dra Silvina Richard

Examinados la Carta de Información a los participantes y el formulario de Consentimiento Informado, referidos al proyecto «Genes Metabolizantes Xenobióticos y Genes Reloj: un enfoque molecular hacia la Cronofarmacología del Cáncer», presentado por la becaria Lic Belén Cerliani, este Comité comprueba que ambos documentos han sido corregidos de acuerdo a las indicaciones realizadas por los miembros del Comité. Por este motivo y en razón de que la formulación del proyecto contempla las recomendaciones enunciadas en el Marco Etico de Referencia para las Investigaciones Biomédicas : Principios Eticos para las Investigaciones Biomédicas en seres humanos, el Comité de Etica en Investigaciones Biomédicas del IMBICE avala la realización del Proyecto.

  
Dra. Lidia A. Vidal Rioja

Coordinadora

Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas – IMBICE

Dra. Lidia A. Vidal Rioja – Coordinadora  
Dr. Luis J. Couyet  
Dr. Eduardo L. Tinant

INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGIA CELULAR  
Calle 526 e/ 10 y 11 - CC 403 - 1900 La Plata – Argentina  
Tel / Fax : (54 221) 421-0112  
E-mail: [administracion@imbice.org.ar](mailto:administracion@imbice.org.ar)

Gonnet, 13 de Mayo de 2013

**Director del IMBICE****Dr. Mario Ermácora****I.P.****Lic. María Belén Cerliani****S/D**

El Comité de Ética y el Comité de Investigación, han evaluado la propuesta de la Lic.. **María Belén Cerliani** en su carácter de **Investigadora Principal** del estudio de referencia, habiendo arribado al presente **DICTAMEN** para la realización del trabajo de investigación cuyos datos son los siguientes:

Título del Estudio:	<b>"Genes metabolizantes xenobióticos y genes reloj: Un enfoque molecular hacia la Cronofarmacología del Cáncer".-</b>
Hoja de información al paciente/sujeto:	<b>Versión 1.0, de fecha abril de 2013</b>
Formulario de Consentimiento Informado:	<b>Versión 1.0 de fecha abril de 2013</b>
Patrocinador:	<b>Sin patrocinio – Autorizado por la dirección del IMBICE y el Laboratorio de Citogenética y Mutagénesis (IMBICE); con la colaboración del área de Hematología y Unidad de Transplante de Médula Ósea del Hospital Prof. R. Rossi.-</b>

Vistos y evaluados los antecedentes y tomando en consideración los siguientes aspectos:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos de las (leyes – declaraciones – disposiciones) del país y Declaración de Helsinki.
- Los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.

Calle 508 e/18 y 19 - (1897) Gonnet, Buenos Aires, Argentina  
Teléfono (+54+221) 484-0290/91/92/94. Interno 151. Fax (+54+221) 471-1593  
e-mail: **cei\_gonnet@yahoo.com.ar**

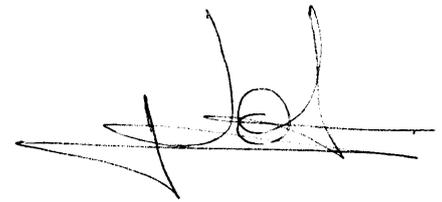
Dr. FRANCISCO A. CANADA  
M.P. 15429  
JEFE de SERVICIO  
DOCENCIA e INVESTIGACION  
H. Z. G. A. SAN ROQUE GONNET



Dr. JUAN PABLO VON ARX  
COORDINADOR COMITÉ  
DE ÉTICA  
HOSP. SAN ROQUE DE GONNET

- El procedimiento para obtener el consentimiento informado, incluyendo la información para los sujetos, el plan de reclutamiento y las compensaciones previstas para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.
- El cumplimiento del Régimen Legal aplicable al ensayo bajo análisis.
- La opinión **FAVORABLE** emitida por el Comité de Ética y de Investigación.

  
Dr. FRANCISCO A. CANÉDA  
M.P. 15429  
JEFE de SERVICIO  
DOCENCIA e INVESTIGACION  
H.Z.G.A. SAN ROQUE GONNET

  
Dr. JUAN PABLO VON ARX  
COORDINADOR COMITÉ  
DE ÉTICA  
HOSP. SAN ROQUE DE GONNET

