

ARTÍCULOS ORIGINALES

EFFECTO DE LOS POLIMORFISMOS GSTT1, GSTM1 Y CYP2E1 EN LA SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA PARA EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PULMÓN EN EL DEPARTAMENTO DEL CAUCA

Nohefía Cajás, Ph.D.*, Luz Stella Hoyos, MSc. *, Hernán Sierra, Ph.D.**

RESUMEN

Según estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en el mundo y su tasa de sobrevivencia a 5 años es tan solo del 10 al 15%. Estudios epidemiológicos han identificado la exposición al humo de cigarrillo como el principal factor de riesgo para desarrollar esta patología; con un mayor riesgo en fumadores pesados (>15 años de consumo). Sin embargo, las características genéticas varían en las poblaciones humanas, y en consecuencia, podrían jugar un papel crucial en la etiología de la enfermedad. Con el objetivo de identificar posibles factores de riesgo a nivel genético que pudieran incrementar la susceptibilidad a desarrollar cáncer pulmonar, se determinó la incidencia de los polimorfismos en los genes GSTM1, GSTT1 y CYP2E1 involucrados en el metabolismo de varios carcinógenos del cigarrillo. Para esto se reclutaron 38 casos con cáncer de pulmón y 92 controles sanos, durante el periodo comprendido entre Abril de 2002 a Octubre de 2004. A cada sujeto se le tomo una muestra de sangre (20 cc) para extraer ADN y realizar la caracterización de los polimorfismos mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el análisis de riesgo para cáncer según el genotipo, solo el polimorfismo GSTT1 nulo estuvo asociado con un incremento significativo en el riesgo de cáncer. El presente estudio confirma la importancia de conducir estudios de epidemiología molecular para establecer el papel de ciertos polimorfismos genéticos en la etiología del cáncer de pulmón. Así mismo, muestra por primera vez el papel de los genes GSTT1 como factor de riesgo genético para el desarrollo del cáncer de pulmón en Colombia.

Recibido para evaluación: Enero 30 de 2005. Aprobado para publicación: Febrero 28 de 2005

* Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca.

** Grupo de Investigación en Genética Humana Aplicada, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca.

Palabras clave: *Polimorfismo genético, susceptibilidad genética, cáncer de pulmón, Cauca, Colombia.*

INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es uno de las patologías de mayor mortalidad y morbilidad en el mundo, causando aproximadamente 1 millón de muertes anuales. En Colombia, las neoplasias malignas ocasionan alrededor del 14% del total de muertes, y el cáncer pulmonar ocupa el segundo lugar en incidencia después del cáncer gástrico.(1) El consumo de cigarrillo es el principal factor de riesgo para cáncer de pulmón, causando aproximadamente del 80 al 90% de los nuevos casos.2 Sin embargo, tan solo un 10-20% de los fumadores desarrollan esta patología, sugiriendo que existen variaciones interindividuales en la sensibilidad a carcinógenos ambientales dadas por diferencias en el metabolismo, el sistema inmune, la reparación de daños al ADN, entre otros. Lo anterior podría explicar las discrepancias en estudios citogenéticos respecto a la asociación entre el consumo de cigarrillo y el incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en diferentes poblaciones.(3-6)

La biotransformación es un proceso que facilita la detoxificación y eliminación de sustancias potencialmente tóxicas generadas durante el metabolismo o que ingresan al organismo en forma de drogas o químicos. La gran mayoría de estos compuestos son agentes indirectos, es decir que requieren activación metabólica de enzimas de la fase I, principalmente de la familia citocromo P450, para su transformación a metabolitos electrofílicos, capaces de reaccionar con el ADN y causar mutaciones. Las enzimas de la fase II o de detoxificación, principalmente glutatión-S-transferasas, catalizan la conjugación de metabolitos reactivos con moléculas hidrofílicas de carga negativa para su eliminación por procesos de excreción.(7) Por lo tanto, es razonable pensar que la eficiencia en el funcionamiento de estas enzimas determinará la concentración de metabolitos reactivos que circulan en el organismo. Estudios mecanísticos han encontrado que la expresión de algunas de estas enzimas esta sujeta a variaciones en la población humana debido a polimorfismos en los genes que las codifican, y que pueden ser las responsables de la susceptibilidad individual a desarrollar enfermedades ambientales como el cáncer.(8-10)

Las enzimas metabólicas GSTM1 y GSTT1 se expresan en el tejido pulmonar y están implicadas en la detoxificación de varios compuestos carcinógenos incluyendo benzo[a]pireno diol-epóxido, aflatoxin-2,3-epóxido y sulfatos reactivos.(11,12) Los genes que co-

difican estas enzimas presentan polimorfismos y sus frecuencias varían ampliamente en la población humana dependiendo de su ubicación geográfica.(13,14) Se ha determinado que los polimorfismos ausentes (o nulos) de los genes GSTM1 y GSTT1 están presentes en el 50% y 30% de la población Caucásica, respectivamente.(15-17) Varios estudios han encontrado un papel significativo de ambos polimorfismos en la susceptibilidad a desarrollar cáncer.(18,19).

La enzima CYP2E1 cataliza la oxidación de varios procarcinógenos de bajo peso molecular incluyendo benceno y N-nitrosaminas, para causar daño al material genético.(20) Se han identificado diferentes polimorfismos en el gen CYP2E1.(10, 21) Uno de ellos incluye dos sustituciones de bases en la región promotora del gen, las cuales están en desequilibrio genético.(21) Este juego de alelos mutantes (sitios de restricción PstI y RsaI) han sido asociados con una regulación alterada de la transcripción y con un incremento en la expresión del gen.(21) Se han reportado diferencias en la frecuencia de estos alelos en diferentes poblaciones humanas y en su asociación con el riesgo a cáncer. (22-24).

El objetivo de este estudio caso-control fue establecer si los polimorfismos en los genes del metabolismo GSTT1, GSTM1 y CYP2E1 son factores de riesgo para el desarrollo de cáncer de pulmón en una población del departamento del Cauca, Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio y muestreo

Los pacientes diagnosticados patológicamente con cáncer pulmonar fueron reclutados secuencialmente en el Hospital Susana López de Valencia de la ciudad de Popayán, Colombia. El protocolo del estudio, los criterios de inclusión y las formas de consentimiento, fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad del Cauca. Los individuos que aceptaron su participación en el estudio fueron entrevistados usando un cuestionario para evaluar su historia de exposición a carcinógenos ambientales y estado de salud. Se estableció la variable cajetillas-año como un indicador de la dosis acumulativa de exposición al cigarrillo, definida como el número de cajetillas (o su fracción) consumidas diariamente multiplicado por el número de años de consumo.(25) Ninguno de los pacientes recibió radio o quimioterapia en el momento de su participación en el estudio. Para los análisis moleculares se colectaron 20 cc de sangre periférica en tubos vacutainer y se aisló ADN de linfocitos usando un kit comer-

cial (Qiagen, USA). Se reclutó un total de 38 pacientes y 98 controles apareados por edad, sexo, procedencia y etnia.

Análisis de polimorfismo en los genes GSTM1 y GSTT1

El análisis genotípico de estos genes se realizó usando el método de PCR con modificaciones a las establecidas por Abdel-Rahman y colaboradores.(26) 50 ng de ADN previamente aislado se amplificó en una mezcla de 50 l conteniendo 30pmol de cada uno de los siguientes primers: para GSTM1 5'GAA CTC CCT GAAAAG CTAAG C y 5'GTT GGG CTCAA TAT ACG GTG G; para GSTT1 5'-GAA CTC CCT GAAAAG CTAAG C, y G2-5'-GTT GGG CTCAA TAT ACG GTG G. Como control interno se amplificó el exón 7 del gen CYP1A1 con los primers 5' GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT y 5' CAG CTG CAT TTG GAAGTG CTC. La solución mezcla de PCR incluyó además 200 mol dNTPs, 5 l de 10X PCR bufer y 2.5 U de ampli Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, Branchburg, NJ). El producto de amplificación se observó en un gel de agarosa al 2% por electroforesis. La delección de los genes GSTT1 y GSTM1 fue detectada por la ausencia de las bandas a 480 y 215 pares de bases (pb) respectivamente.

Análisis de polimorfismo en el gen CYP2E1

La frecuencia del polimorfismo en este gen se realizó combinando los métodos de PCR y RFLP establecidos por Kato y colaboradores.(22) La mezcla de PCR (50 l volumen total) incluyó 100 ng de ADN, 35 pmol de los primers para amplificar la región polimórfica de CYP2E1 cuyas secuencias son: 5' CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA y 5'TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG; 200 mol dNTPs, 5 l de 10X bufer, 1.5 mM MgCl₂ y 2.5 U de ampli Taq DNA polimerasa (Perkin Elmer, Branchburg, NJ). Después de la amplificación el producto de PCR (banda a 410 pb) se sometió a digestión por 6 horas a 37 C con 10 U de la enzima de restricción Pst I la cual reconoce y corta el sitio polimórfico para producir 2 bandas adicionales a 290 y 210 pb en individuos heterocigotos o una banda a 210 en individuos homocigotos para la mutación.(21)

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS para Windows, versión 10 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Las diferencias entre las medias de las variables de los casos y los controles se evaluaron mediante la prueba de la t de Student y la distribución de variables, mediante la prueba de χ^2 . Para determinar la asociación entre cada variable y riesgo a cáncer pulmonar, el valor dicotómico de estado del sujeto (caso vs. control) fue comparado con cada variable para estimar el riesgo (OR) y los intervalos de confianza al

95%, utilizando un modelo de regresión logístico múltiple. Los OR fueron ajustados por factor de exposición (cigarrillo, humo de leña y plaguicidas), edad (variable continua) y sexo. Las pruebas de χ^2 generadas por el modelo evaluaron la hipótesis nula de no asociación entre el estado de cada sujeto y cada variable. Un nivel de probabilidad menor de 0.05 ($p < 0.05$) fue utilizado como criterio de significancia estadística. Los valores de probabilidad reportados corresponden a pruebas de dos colas.

RESULTADOS

Características de la población de estudio

La Tabla 1 muestra las características demográficas de la población. Se incluyeron en el estudio un total de 38 pacientes recién diagnosticados con cáncer de pulmón, no tratados y 92 controles sanos. En cuanto a los parámetros edad, sexo, procedencia y grupo étnico, se observó que el 63% de los individuos con cáncer fueron mayores de 60 años, el 66 % fueron hombres, el 68% de procedencia urbana y 82% fueron mestizos. Como se muestra en la Tabla no se encontró diferencia significativa en las variables edad, sexo, procedencia y grupo étnico entre los casos y los controles, indicando éxito en el apareamiento entre casos y controles. Por otro lado, aunque se trató de coleccionar fumadores pesados en el grupo control, el análisis estadístico muestra que el grupo de casos tuvo un mayor porcentaje de fumadores pesados comparado con el grupo control (63,65 55,75 vs. 34,37 20,38 cajetillas-año, respectivamente, $p = 0.001$). El mismo fenómeno ha sido observado en otros estudios de este tipo.(25, 27)

Caracterización de los polimorfismos GSTT1, GSTM1 y CYP2E1

La Tabla 2 muestra la distribución de los polimorfismos y su asociación con el riesgo a desarrollar cáncer pulmonar en la población de estudio. De los polimorfismos analizados solo la delección del gen GSTT1 presentó un efecto estadísticamente significativo en el riesgo a cáncer de pulmón con un OR ajustado de 2.6, 95% IC = 1,04-6,33. El ajuste se realizó teniendo en cuenta las variables edad, sexo, consumo de cigarrillo, exposición a humo de leña y exposición a plaguicidas. La incidencia del polimorfismo GSTM1 fue similar en casos y controles y por lo tanto no estuvo asociado con un riesgo significativo de cáncer. Respecto al efecto del polimorfismo en el gen CYP2E1, el genotipo homocigoto mutante c2/c2 estuvo asociado con un incremento de 7.1 veces mayor al cáncer de pulmón pero este no fue significativo.

Tabla 1. Características demográficas de la población de estudio.

Características	Casos (%)	Controles (%)	P
Total	38 (100)	92 (100)	N.A.
Edad (años)			
Media \pm DS	63,29 \pm 11,60	59,54 \pm 10,05	0,067 ^a
\leq 50	5 (13)	17 (18)	
51-60	9 (24)	32 (35)	
$>$ 60	24 (63)	43 (47)	0,234 ^b
Sexo			
Femenino	13 (34)	28 (30)	
Masculino	25 (66)	64 (70)	0,683 ^b
Procedencia			
Urbana	26 (68)	61 (66)	
Rural	12 (32)	31 (34)	1,000 ^b
Grupo étnico			
Indígena	1 (2)	1 (1)	
Negro	6 (16)	5 (5)	
Mestizo	31 (82)	86 (94)	0,120 ^b
Consumo cigarrillo ^c			
Media \pm DS	63,65 \pm 55,75	34,37 \pm 20,38	0,001 ^a

^a Prueba de *t* para la comparación de medias.

^b Prueba de χ^2 para la comparación de proporciones.

^c Estimado en cajetillas-año = número de cajetillas/día x número de años fumando.

Abreviaturas: P = probabilidad; N.A. = no aplica; DS = desviación estándar.

Tabla 2. Distribución de genotipo y riesgo asociado (OR) a cáncer de pulmón.

Genotipo	Casos (%)	Controles (%)	OR ^a (95% IC)	OR ^b (95% IC)
GSTT1				
Ausente	17 (47)	24 (28)	1,0 ^c	
Presente	19 (53)	63 (72)	2,3 (1,05-5,26)	2,6 (1,04-6,33) ^d
GSTM1				
Ausente	18 (50)	48 (55)	1,0 ^c	
Presente	18 (50)	39 (45)	0,8 (0,37-1,77)	0,6 (0,27-1,52)
CYP2E1				
c1/c1	24 (69)	68 (79)	1,0	
c1/c2	8 (23)	17 (20)	1,3 (0,51-3,48)	1,4 (0,51-4,00)
c2/c2	3 (8)	1 (1)	8,5 (0,84-85,6)	7,1 (0,50-100)

^a Riesgo crudo.

^b Riesgo ajustado en el modelo de regresión logística múltiple agregando las covariables edad, sexo, consumo de cigarrillo, exposición a humo de leña y exposición a plaguicidas.

^c Categoría de referencia.

^d $p < 0,05$.

Abreviaturas: IC = intervalo de confianza; c1/c1 = tipo silvestre; c1/c2 = heterocigoto; c2/c2 = homocigoto mutante.

DISCUSIÓN

Características de la población

La población de los casos estuvo representada en su mayoría (63%) por individuos mayores de 60 años. Esta proporción es consistente con lo establecido en la etiología del cáncer esporádico, el cual se presenta en edades avanzadas producto de la exposición prolongada a los factores de riesgo tardando alrededor de 20 años en desarrollarse.(28)

En cuanto a la exposición al cigarrillo, se observó que el grupo de casos presentaron un mayor número de cajetillas-año, lo que coincide con otros estudios epidemiológicos indicando que el riesgo al cáncer de pulmón incrementa proporcionalmente al número de cigarrillos y los años de exposición.(29) En cuanto a la distribución de los grupos étnicos, se observó que el mayor número de casos estuvo representado por individuos mestizos (82%) y se presentaron muy pocos casos de los grupos indígena y negro. Se podría pensar que estos grupos étnicos se encuentran en menor nivel de exposición a los factores de riesgo ambientales o que no recurren oportunamente al diagnóstico y tratamiento clínico de la enfermedad como lo podrían hacer los individuos del grupo mestizo, debido posiblemente a factores socioculturales, económicos o de accesibilidad a los servicios de salud. Sin embargo, el tamaño muestral del presente estudio no permite concluir que efectivamente esta es la situación en realidad y por lo tanto es necesario ampliar el estudio para responder a esta hipótesis.

Efecto de los polimorfismos en el riesgo a cáncer pulmonar

Ha sido claramente establecido que el desarrollo de cáncer es producto de la interacción entre factores genéticos y ambientales.(29) Más importante aún, estudios en la etiología del cáncer han encontrado que al igual que los factores de exposición, muchos determinantes genéticos del cáncer también pueden variar entre los individuos. Un claro ejemplo de cáncer ambiental es el carcinoma de pulmón el cual es producido en un 90% por el consumo de cigarrillo. Sin embargo, estudios epidemiológicos muestran que tan solo un 10-20% de fumadores eventualmente desarrollan cáncer de pulmón(30), indicando que procesos biológicos en los individuos expuestos contribuyen de manera significativa en la modulación de la respuesta tóxica. El metabolismo es un proceso importante en la determinación del potencial carcinogénico de xenobióticos.(31)

En el presente estudio, se observó que el polimorfismo en el gen GSTT1 consistente en la delección completa del gen es un factor de riesgo genético importante para cáncer de

pulmón. La presencia de esta variación aumentó 2.6 veces el riesgo a desarrollar cáncer pulmonar (Tabla 2). El grupo de enzimas glutatión-s-transferasas esta involucrado en la detoxificación de epóxidos de hidrocarburos aromáticos policíclicos los cuales son potentes carcinógenos pulmonares.(11) Estas enzimas catalizan la conjugación de estos metabolitos electrofilicos con la molécula nucleofílica glutatión (GSH) para inhibir su reacción con moléculas como ADN.(33) Por lo tanto, la delección de este gene puede contribuir a aumentar el riesgo al cáncer de pulmón por la acumulación de metabolitos reactivos. Por otro lado, los genes GSTM1 y CYP2E1 no estuvieron asociados significativamente al riesgo de cáncer en el presente estudio. Esto pudo deberse al reducido tamaño de la muestra que no permitió establecer la incidencia real de estos polimorfismos en la población.

En conclusión, nuestro estudio brinda evidencia sobre la importancia de la variabilidad genética de cada individuo en la susceptibilidad al desarrollo del cáncer de origen ambiental. La evaluación de susceptibilidad al cáncer basada en el análisis de una sola enzima puede no ser suficiente dada la complejidad del proceso metabólico y de la mezcla de químicos a las que un individuo esta expuesto. Por lo tanto, se evaluó el efecto de tres enzimas diferentes, todas implicadas en el metabolismo de carcinógenos del cigarrillo. A pesar de la limitación en el tamaño de la muestra, nuestros resultados indican que el genotipo nulo para GSTT1 está asociado con un aumento significativo en el riesgo a desarrollar cáncer pulmonar en el Cauca.

BIBLIOGRAFÍA

1. **PAHO.** Colombia Health Profile. En: Pan American Health Organization, ed. Health in the Americas Vol. II. Washington, D.C.: PAHO; 1998. pp 181-93.
2. **Shopland DR.** Tobacco use and its contribution to early cancer mortality with a special emphasis on cigarette smoking. *Environ Health Perspect* 1995;103 Suppl 8:131-142.
3. **Sinues B, Izquierdo M, Perez VJ.** Chromosome aberrations and urinary thioethers in smokers. *Mutat Res* 1990;240:289-293.
4. **Oesch F, Hengstler JG, Fuchs J.** Cigarette smoking protects mononuclear blood cells of carcinogen exposed workers from additional work exposure-induced DNA single strand breaks. *Mutat Res* 1994;321:175-185.
5. **Kasuba V, Sentija K, Garaj-Vrhovac V, Fucic A.** Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from control individuals. *Mutat Res* 1995;346:187-193.

6. **Au WW, Cajas-Salazar N, Salama S.** Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutat Res* 1998;400:467-478.
7. **Wright AS.** The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mutat Res* 1980;75:215-241.
8. **Perera FP.** Environment and cancer: who are susceptible? *Science* 1997;278:1068-1073.
9. **Seidegard J, Vorachek WR, Pero RW, Pearson WR.** Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci* 1988;85:7293-7297.
10. **Uematsu F, Kikuchi H, Ohmachi T, Sagami I, Motomiya M, Kamataki T, et al.** Two common RFLPs of the human CYP2E gene. *Nucleic Acids Res* 1991;19:2803.
11. **Hayes JD, Pulford DJ.** The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995;30:445-600.
12. **Moscow JA, Fairchild CR, Madden MJ, Ransom DT, Wieand HS, O'Brien EE, et al.** Expression of anionic glutathione-S-transferase and P-glycoprotein genes in human tissues and tumors. *Cancer Res* 1989;49:1422-1428.
13. **Board PG.** Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *Am J Hum Genet* 1981;33:36-43.
14. **Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, et al.** Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994;300(Pt 1):271-276.
15. **Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW.** Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1159-1164.
16. **London SJ, Daly AK, Cooper J, Navidi WC, Carpenter CL, Idle JR.** Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County, California. *J Natl Cancer Inst* 1995;87: 1246-1253.
17. **Rebeck TR.** Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:733-743.
18. **d'Errico A, Malats N, Vineis P, Boffetta P.** Review of studies of selected metabolic polymorphisms and cancer. *IARC Sci Publ* 1999; 148:323-393.
19. **Hayes JD, Strange RC.** Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology* 2000 Sep;61 (3):154-66 2000;61:154-166.
20. **Guengerich FP, Kim DH, Iwasaki M.** Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem Res Toxicol* 1991;4:168-179.
21. **Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K.** Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem* 1991;110:559-565.
22. **Kato S, Shields PG, Caporaso NE, Hoover RN, Trump BF, Sugimura H, et al.** Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res* 1992;52:6712-6715.
23. **Haque AK, Au W, Cajas-Salazar N, Khan S, Ginzell AW, Jones DV, et al.** CYP2E1 polymorphism, cigarette smoking, p53 expression, and survival in non-small cell lung cancer: a long term follow-up study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2004;12:315-322.
24. **Agundez JA.** Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab* 2004;5:211-224.
25. **Cajas-Salazar N, Sierra-Torres CH, Salama SA, Zwischenberger JB, Au WW.** Combined effect of MPO, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms on chromosome aberrations and lung cancer risk. *Int J Hyg Environ Health* 2003;206:473-483.
26. **Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW.** A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett* 1996;107:229-233.
27. **Zhao H, Spitz MR, Gwyn KM, Wu X.** Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in non-Hispanic whites. *Mol Carcinog* 2002;33:99-104.
28. **Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J.** Cancer and ageing in mice and men. *Br J Cancer* 1975;32:411-426.
29. **Doll R, Peto R.** The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 1981;66:1191-1308.
30. **Hirvonen A.** Genetic factors in individual responses to environmental exposures. *J Occup Environ Med* 1995;37:37-43.
31. **Miller JA, Miller EC.** Metabolic activation and reactivity of chemical carcinogens. *Mutat Res* 1975;33:25-26.
32. **Seidegard J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG, Beattie EJ.** Isoenzyme(s) of glutathione transferase (class Mu) as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis* 1990;11:33-36.
33. **Platt KL, Utesch D, Gemperlein-Mertes I, Glatt HR, Oesch F.** Metabolizing systems in short-term in vitro tests for carcinogenicity. *Food Chem Toxicol* 1986; 24:721-729.