

Tesi doctoral

2007

Exposició a contaminants atmosfèrics  
i càncer de bufeta urinària a Espanya

Gemma Castaño Vinyals

Bartomeu Garcia i Subirà, 6 3r 2a

08830 Sant Boi de Llobregat

E-mail: [gcastano@imim.es](mailto:gcastano@imim.es)

Telèfon: 678 44 59 21





Departament de Ciències Experimentals i de la Salut  
Programa de Doctoral en Ciències de la Salut i la Vida  
Universitat Pompeu Fabra (UPF)

# Exposició a contaminants atmosfèrics i càncer de bufeta urinària a Espanya

Memòria presentada per la Gemma Castaño Vinyals per optar al títol de Doctora per la Universitat Pompeu Fabra. Treball realitzat sota la direcció del Dr. Manolis Kogevinas i la tutoria del Dr. Josep Maria Antó al Centre de Recerca en Epidemiologia Ambiental (CREAL), antigament Unitat de Recerca Respiratòria i Ambiental (URRA), de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM).  
Programa de Doctorat de la Universitat Pompeu Fabra.

Gemma Castaño Vinyals  
Candidata

Dr. Manolis Kogevinas  
Director de la tesi

Dr. Josep Maria Antó  
Tutor

Dipòsit legal: B.32072-2008  
ISBN:

## PRESENTACIÓ DE LA TESI

La tesi que es presenta a continuació és un recull d'articles., els quals conformen el cos principal del document. Va precedida per una introducció al tema i la presentació dels projectes que formen part d'aquesta tesi, i al final hi ha un capítol de discussió i conclusions. Quatre dels articles presentats estan emmarcats dins el projecte Epicuro o Spanish Bladder Cancer Study, finançat principalment per l'Institut Nacional de Càncer (NCI) dels Estats Units, amb l'objectiu d'estudiar l'etiologia del càncer de bufeta a Espanya. Vaig començar a treballar en l'estudi durant l'últim any de la meua carrera de Ciències Ambientals, i fruit d'aquest treball va sortir el meu projecte de final de carrera i la introducció al món de l'epidemiologia ambiental. Vaig seguir la meua trajectòria dins l'estudi com a becària predoctoral i coordinadora del treball de camp. El meu tema d'estudi era la relació de la contaminació atmosfèrica amb el càncer de bufeta urinària. Per tal d'aprofundir coneixements en la part de l'exposició, vaig involucrar-me en estudis de contaminació atmosfèrica com el Heapss, del qual en presento un article, el que fa referència a la meua implicació en el projecte. Durant la meua recerca predoctoral vaig fer estades a l'estranger, a San Francisco, Cincinnati i Utrecht, per aprendre la tècnica analítica dels aductes d'ADN. Com a coordinadora del treball de camp vaig col·laborar també en altres aspectes de l'estudi a part de la contaminació atmosfèrica. El resultat de tot això és aquesta tesi.

## AGRAÏMENTS

Aquest apartat és per donar gràcies a tota la gent que m'ha ajudat, directa o indirectament, a arribar a aquest punt de la meva trajectòria personal i professional. M'he trobat molta gent a la que haig d'agrair, així que perdoneu les possibles omissions, són sense mala intenció:

Al Manolis, el meu director de tesi, que s'ha carregat de paciència per ensenyar-me i m'ha brindat grans oportunitats dins el món de la recerca. De fet, ell és el responsable d'això després de fascinar-me durant les seves classes de Salut Ambiental durant la carrera.

A l'Ana pel seu suport, ajuda, "bon rollo", somriure i amistat incondicional des del primer dia que vaig entrar per la porta de l'IMIM.

Al Paco, treballant junts per l'estudi (encara recordo aquell dia que vam quedar-nos a l'IMIM fins a les 12 de la nit per una de les "famoses" conference calls) i sempre a punt per a resoldre els meus dubtes d'ignorant en estadística. Encara tenim pendent un Genil.

A la Núria i al Paco Real, ha estat un plaer treballar amb vosaltres i us agraeixo els coneixements que m'heu transmès.

A les Gemmes, que tot i que renyaven a la gent que passava davant el seu despatx sense dir bon dia (sobretot la Punyis), sempre estaven allà per a ajudar-nos a la feina i engrescar-nos en qualsevol aventura.

A les amistats forjades a partir del tracte diari, l'Àlex, la Gema, la Lurdes, l'Estela, amistat dins i fora de la feina. Aquelles festes, sortides i dinars que espero que mai s'acabin.

A tota la gent del CREAL, als poquets que al principi érem al despatx de l'antic edifici de l'IMIM (Cristina Villanueva, Merche, Xavi, Laura Muñoz, Núria, Laura Bouso, Joju) fins a tots els que som ara al despatx del nou PRBB: Bene, Inma, Cristina Rebordosa, Carlos, Joan, Estel, Raquel, David i Laia.

A la Merche pel simpatic "bon dia" que encara em dóna cada dia al matí, i a la Yolanda pel seu "bona tarda" quan marxava cap a casa.

A la Mercè Manyós per la seva ajuda i perseverança en la recerca de beques per marxar a l'estranger.

Al Dave, sempre disposat a donar un cop de mà quan ja ens surt fum del cap i de l'ordinador per a resoldre problemes informàtics.

A tots els equips de l'estudi, al Vallès, Elx, Astúries i Tenerife, que em van acollir en les meves visites.

To Mustafa, Ken, Debra, Montse and Nat at the National Cancer Institute. I learnt a lot working with you. Thanks for your help and advice.

To Roel and Juan, working from the distance, then *in situ*.

A tots els participants anònims que han contestat l'entrevista, han donat sang i han contribuït a la recerca i a fer possible aquesta tesi.

To everyone who helped me during my stay in San Francisco. Joe Patoka, Brian, John, Joe Wiemels, Patrick and Dr. Zheng who put effort in teaching me laboratory techniques, and more. Wendy (por una amistad, aunque lejana, incondicional), Walter (I miss your beer, among other things), Tracy and Tara for our dinners in your house, my house, restaurants on 9th Ave and Mission. Julianna fue un placer conocerte y te deseo lo mejor. Gloria gracias por tu amistad y nuestros buenos ratos charlando y la comodidad de tu apartamento. John, no words needed, just a big thanks for the time spent together.

To Glenn and Laura, just thank you for everything and for helping me making my stay more comfortable.

To my dear Brenda (“I’ve checked myself for radioactivity”) for our lunches, shopping moments, teaching with the kids and all the good times we spent.

To Michelle and Bobbie, who changed my view of Cincinnati from a dark and cold place to the warmth of their house.

A les fonts de finançament rebudes per a poder realitzar aquesta tesi: al National Cancer Institute de Bethesda, Estats Units, per la beca interna; a l’Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i Recerca (AGAUR) dins el Departament d’Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya, per la beca BE d’estades de recerca fora de Catalunya (2002BEAI200006); a la xarxa europea d’excel·lència ECNIS (Environmental Cancer Risk, Nutrition and Individual Susceptibility) per la beca de formació durant l’estada a Utrecht.

Als companys de carrera, l’Alba, la Maria José, la Nu, l’Alfons i la Sònia i el Javi, el Xavi, i l’Efred amb qui vaig compartir molts moments i que espero seguir compartint. Ens veiem al lloc de sempre.

Als meus amics fora de l’àmbit laboral, que m’han aguantat, m’han fet costat i sempre han estat allà per escoltar les meves aventures, alegries, penes... Gràcies Mònica i Guillem, Anna i Xavi, Sandra i David. També a la Raquel, l’Òscar, el Lluís, l’Anna. A la Sita, incansable, imparable.

Al Jordi, per aguantar-me dia a dia. Per recolzar-me en aquesta etapa. Per la portada.

A la meva família, especialment a la meva mare i les meves germanes, al meu tiet, a l’Ana i el Siscu, la iaia i els avis, pel seu suport dia a dia i la confiança dipositada.

Tot i que semblava interminable, aquí us presento el treball que he fet durant aquests últims anys.





**ÍNDEX***PRESENTACIÓ DE LA TESI**AGRAÏMENTS**ÍNDEX*

ACRÒNIMS	1
RESUM	3
RESUMEN	9
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓ	21
1. Contaminació atmosfèrica, 21	
2. Hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs), 22	
3. Efectes sobre la salut, 24	
4. Càncer de bufeta urinària, 28	
5. Aductes i radioetiquetatge amb fòsfor-32, 34	
6. Susceptibilitat genètica i càncer de bufeta urinària, 36	
7. Estudi HEAPSS, 38	
8. Estudi EPICURO, 39	
JUSTIFICACIÓ	41
OBJECTIUS	43
METODOLOGIA I RESULTATS	45
Article 1. Aalto P et al.	45
Journal of the Air & Waste Management Association 2005	
Article 2. Castaño-Vinyals G et al.	71
Occupational and Environmental Medicine 2007	
Article 3. Castaño-Vinyals G et al.	89
Occupational and Environmental Medicine 2004	

---

Article 4. Castaño-Vinyals G et al.	113
Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2007	
Article 5. Garcia-Closas M et al.	129
Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2006	
DISCUSSIÓ	149
1. Exposició, 150	
2. Biomarcadors, 153	
3. Malaltia, 154	
4. Susceptibilitat, 154	
5. Limitacions del treball, 155	
6. Línees de recerca en el futur, 156	
CONCLUSIONS	159
IMPLICACIONS I RECOMANACIONS	159
REFERÈNCIES	161
ANNEXOS	171
Annex 1. Entrevista a casos i controls	171
Annex 2. Esquema del procediment analític del radioetiquetatge amb fòsfor-32	179
Annex 3. Protocol detallat del radio-etiquetatge amb fòsfor-32	181

## ACRÒNIMS

AINE:	Antiinflamatoris no esteroïdals
B(a)P:	Benzo(a)Pyrene (benzo(a)pirè)
BER:	Base Excision Repair
CAPI:	Computer Assisted Personal Interview (Entrevista Personal Assistida per Ordinador)
CI:	Confidence Interval (Interval de Confiança)
CO:	Monòxid de Carboni
CYP:	Citrocrom P450
DSBR:	Double-Strand Break Repair (Reparació per Trencament de la Cadena Doble)
EPICURO:	Epidemiology of Cancer of Urothelium (Epidemiologia del Càncer d'Uroteli)
GST:	Glutathione S-transferase (Glutatió S-transferasa)
IARC:	International Agency for Cancer Research (Agència Internacional d'Investigació Sobre Càncer)
OMS:	Organització Mundial de la Salut
OR:	Odds Ratio (Raó d'Odds)
NAT:	N-acetyltransferase (N-acetiltransferasa)
NER:	Nucleotide Excision Repair (Reparació per Excisió de Nucleòtids)
NO <sub>2</sub> :	Diòxid de Nitrogen
PAHs:	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Hidrocarburs Aromàtics Policíclics)
PM <sub>10</sub> :	Partícules inferiors a 10 micròmetres de diàmetres, que poden penetrar al tracte respiratori superior (nas, gola)
PM <sub>2.5</sub> :	Partícules inferiors a 2.5 micròmetres de diàmetres, que poden penetrar al tracte respiratori inferior
THM:	Trihalometans
PST:	Partícules en Suspensió Totals
SBC:	Spanish Bladder Cancer



## RESUM

### INTRODUCCIÓ I OBJECTIUS

La contaminació atmosfèrica s'ha associat amb diversos efectes adversos en la salut, incloent un augment del risc de càncer de pulmó. Els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs en la seva denominació anglesa) són contaminants atmosfèrics que poden estar presents en l'aire que respirem, normalment adherits a partícules. En l'àmbit laboral, l'exposició a hidrocarburs aromàtics policíclics s'ha associat amb un increment dels risc de càncer de bufeta urinària.

Hi ha molta menys evidència científica de l'exposició ambiental a PAHs i altres contaminants atmosfèrics i el risc de càncer de bufeta. Els metabòlits del pirè, un dels components dels PAHs, i els aductes d'ADN s'han utilitzat com a biomarcadors de l'exposició a nivells elevats d'hidrocarburs aromàtics policíclics. La reparació per excisió de nucleòtids és un procés crític per a protegir l'ADN contra el dany de carcinògens que formen aductes, com els PAHs. Estudis funcionals en humans han demostrat que la variació comú en els gens de la via de reparació de l'ADN per excisió de nucleòtids pot afectar la capacitat de reparació de l'ADN, i estudis epidemiològics han proporcionat evidències recolzant el seu paper en la patogènesi de càncers relacionats amb el consum de tabac.

L'objectiu d'aquesta tesi és avaluar els diferents passos en el camí que va des de l'exposició (contaminants atmosfèrics/PAHs) fins a la malaltia (càncer de bufeta). Específicament, vam mesurar a llarg termini la concentració del nombre total de partícules a Barcelona i a altres quatre àrees metropolitanes d'Europa. Vam examinar si l'exposició continuada a contaminació atmosfèrica està associada amb el risc de càncer de bufeta en un estudi cas-control de base hospitalària a Espanya. Al mateix estudi, vam investigar la relació entre els aductes voluminosos d'ADN-PAHs en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica i el càncer de bufeta en individus no fumadors. Addicionalment, vam estudiar l'associació entre la formació d'aductes

d'ADN i alguns indicadors de contaminació atmosfèrica. Finalment, vam avaluar la influència de les variants genètiques comuns en la via de reparació de l'ADN per excisió de nucleòtids en el risc de càncer de bufeta.

## MÈTODES

Les mesures de les partícules ultrafines es van dur a terme a Augsburg, Barcelona, Hèlsinki, Roma, i Estocolm utilitzant el mateix instrument, un comptador de partícules per condensació (TSI model 3022), emmarcat dins l'estudi Efectes sobre la Salut de la Contaminació Atmosfèrica en Subpoblacions Susceptibles - Health Effects of Air Pollution on Susceptible Subpopulations (HEAPSS).

L'estudi Espanyol de Càncer de Bufeta (Spanish Bladder Cancer en endavant) és un estudi cas-control a Espanya que inclou 1219 casos incidents de càncer de bufeta i 1271 controls hospitalaris. Es va recollir informació sobre la història residencial incloent diversos indicadors de l'exposició a contaminació atmosfèrica i altres factors de risc potencials en una entrevista personal informatitzada cara a cara. Es va dur a terme una revisió sistemàtica de la literatura per avaluar si els nivells de metabòlits del pirè i els aductes d'ADN i de proteïnes es correlacionaven amb nivells baixos d'exposició a PAHs. La revisió sistemàtica va identificar 35 estudis amb més de 10 individus que avaluaven contaminació atmosfèrica a PAHs en relació amb metabòlits de PAHs, principalment hidroxipirè (1-OHP), aductes d'ADN-PAHs o aductes en proteïnes.

També vam mesurar els nivells d'aductes d'ADN en un subgrup d'individus de l'Estudi Spanish Bladder Cancer que estava compost de 76 casos no fumadors i 76 controls aparellats individualment per sexe, regió de residència, edat i hàbit tabàquic (ex-fumadors o no fumadors). Per tal de maximitzar la rellevància de la mesura d'aductes d'ADN com a indicador de l'exposició a PAHs, els individus es van seleccionar entre aquells que no havien canviat la residència, la feina ni cap dels seus estils de vida principals durant els últims 10 anys. Els aductes voluminosos d'ADN es van mesurar amb la tècnica del radioetiquetatge amb fòsfor-32, tractament de la nucleasa P1.

Vam analitzar 22 polimorfismes en un únic nucleòtid (Single Nucleotide Polymorphisms - SNP d'ara en endavant) en set gens de la via de reparació de l'ADN per excisió de nucleòtids (XPC, RAD23B, ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5, i ERCC6).

La genotipació es va fer per aquells subjectes que s'havia pogut obtenir ADN, que foren un total de 1150 casos i 1149 controls de l'Estudi Spanish Bladder Cancer. Els Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) van ser determinats utilitzant els assajos de Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) o Golden Gate (Illumina, San Diego, CA). Els SNPs es van seleccionar afavorint els SNPs no sinònims, aquells que s'havien avaluat anteriorment en relació amb el risc de càncer de bufeta urinària o aquells que presentaven evidències de significació funcional.

## RESULTATS

De l'estudi HEAPSS, els resultats mostren que en totes les ciutats estudiades, les concentracions de partícules ultrafines a l'hivern són major que a l'estiu. A Roma i a Barcelona, els hiverns estan més contaminats comparat amb l'estiu per un factor entre 4 i 10. El màxim de l'hivern tant a Roma com a Barcelona està a prop de  $100.000 \text{ cm}^{-3}$ , mentre que el mínim a l'estiu és  $>10.000 \text{ cm}^{-3}$ . La màxima diària a Hèlsinki i Estocolm és semblant o fins i tot més baixa que la mínima diària de les ciutats més contaminades. Les concentracions entre aquests dos grups de ciutats es diferencia per un factor aproximat de cinc durant tot el dia.

De l'estudi Spanish Bladder Cancer sobre contaminació atmosfèrica i càncer de bufeta, els resultats mostren que viure més de 40 anys en una ciutat amb més de 100.000 habitants està associat amb un increment del risc de càncer de bufeta en conjunt (OR=1.30, CI 1.04-1.63).

Les emissions de PAHs i gasoil de les indústries situades prop del lloc de residència, avaluades per experts, estaven associades amb un increment del risc (OR=1.29, 0.85-1.98), mentre que no es va observar excés de risc o l'observat era menor per les altres variables de contaminació. Les raons d'odds entre no fumadors tendien a ser més altes que les de fumadors.

Els metabòlits de PAHs i, en menor mesura, els aductes d'ADN-PAHs es correlacionen bé a nivell de grup amb l'exposició a benzo(a)pirè fins i tot a nivells baixos de contaminació atmosfèrica. Es va trobar una correlació estadísticament significativa entre els valors mitjans de benzo(a)pirè transformats logarítmicament i els valors mitjans transformats logarítmicament de 1-hidroxi-pirè (coeficient de correlació de Pearson,  $r=0.76$ ;  $p=0.001$ ), en base a 17 parells de dades de benzo(a)pirè i 1-hidroxi-pirè.



La correlació entre estudis que van utilitzar la mitjana de benzo(a)pirè provinent de mesures estacionàries i la mitjana d'aductes d'ADN era significativa amb un coeficient de correlació de Pearson de 0.60 ( $p=0.038$ ) en base a 12 parells de dades transformades logàritmicament de benzo(a)pirè i aductes provinents de 3 estudis.

En la nostra avaluació dels aductes voluminosos d'ADN en individus de l'estudi Spanish Bladder Cancer, el percentatge d'aductes detectables era major en controls (41%) que en casos (32%) amb una OR de 0.75 (95%CI 0.36-1.58). En una anàlisi limitada als controls, es va trobar un percentatge més alt d'aductes d'ADN entre els quals la seva última residència va ser una gran ciutat (50%) comparat amb els que van viure en pobles (19%);  $p$ -valor=0.04. No es van trobar associacions consistents amb cap altre indicador de contaminació atmosfèrica.

Individus amb el genotip variant per SNPs en quatre dels set gens avaluats presentaven petits increments del risc de càncer de bufeta comparat amb individus amb el genotip homozigot salvatge: RAD23B IVS5-15A>G (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.5;  $P = 0.01$ ), ERCC2 R156R (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.6;  $P = 0.006$ ), ERCC1 IVS5+33A>C (OR, 1.2; 95% CI, 1.0-1.5;  $P = 0.06$ ;  $P$ -tendència = 0.04), i ERCC5 M254V (OR, 1.4; 95% CI, 1.0-2.0;  $P = 0.04$ ). Una anàlisi global dels efectes de la via indicava que la variació genètica en la via de reparació de l'ADN per excisió de nucleòtids caracteritzada pels 22 SNPs analitzats prediu significativament el risc de càncer de bufeta ( $P = 0.04$ ). Comparacions de parells van suggerir que ser portador de variants en dos gens pot resultar en un increment substancial del risc.

## DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

De l'estudi HEAPSS, podem concloure que Barcelona i les altres ciutats sud-europees estan més contaminades que les ciutats nord-europees. Les associacions trobades entre els diferents indicadors de contaminació atmosfèrica i el càncer de bufeta dins de l'estudi Spanish Bladder Cancer són de petites a moderades. Suggereixen un excés de risc però cal una avaluació posterior en altres escenaris per a confirmar-ho. L'ús de biomarcadors hauria de ser implementat àmpliament en combinació amb tècniques més tradicionals per l'avaluació de la població general de l'exposició a PAHs provinents de la contaminació atmosfèrica.

En aquest estudi entre no fumadors amb estils de vida i ambientals estables, els aductes voluminosos d'ADN no es van associar al risc de càncer de bufeta. Els resultats no recolzen una associació del risc de càncer de bufeta amb nivells baixos d'exposició a PAHs, mesurat a través de la formació d'aductes voluminosos d'ADN en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica. Els resultats de l'anàlisi genètica recolzen la influència de la variació genètica en el càncer de bufeta urinària.

En conjunt, aquesta tesi estudia el risc de càncer de bufeta en associació amb contaminants atmosfèrics incloent PAHs que han estat associats amb càncer de bufeta en escenaris on l'exposició era elevada. Els nivells de contaminació atmosfèrica a Barcelona són molt elevats, però l'associació que s'observa amb els indicadors de contaminació atmosfèrica utilitzats és baixa. Tot i això, la tendència positiva i de confirmar-se, ens enfrontem a un gran problema de salut pública. Els aductes voluminosos d'ADN per a nivells baixos d'exposició a PAHs no s'associen al risc de càncer de bufeta, però sí que hi ha una indicació d'associar-se a algun indicador de contaminació atmosfèrica. Cal confirmar aquests resultats tenint en compte les altres vies d'exposició a PAHs i els polimorfismes en els gens implicats en la reparació d'aquest dany a l'ADN.



## RESUMEN

### INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La contaminación atmosférica se ha asociado con diversos efectos adversos en la salud, incluyendo un aumento del riesgo de cáncer de pulmón. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs en su denominación inglesa) son contaminantes atmosféricos que pueden estar presentes en el aire que respiramos, normalmente adheridos a partículas. En el ámbito laboral, la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos se ha asociado con un incremento del riesgo de cáncer de vejiga urinaria. Hay mucha menos evidencia científica de la exposición ambiental a PAHs y a otros contaminantes atmosféricos y el riesgo de cáncer de vejiga. Los metabolitos del pireno, uno de los componentes de los PAHs, y los aductos de ADN se han utilizado como biomarcadores de la exposición a niveles elevados de hidrocarburos aromáticos policíclicos. La reparación por eliminación de nucleótidos es un proceso crítico para proteger el ADN contra el daño de carcinógenos que forman aductos, como los PAHs. Estudios funcionales en humanos han demostrado que la variación común en los genes de la vía de reparación del ADN por eliminación de nucleótidos puede afectar la capacidad de reparación del ADN, y estudios epidemiológicos han proporcionado evidencias apoyando su papel en la patogénesis de cánceres relacionados con el consumo de tabaco.

El objetivo de esta tesis es evaluar los diferentes pasos en el camino que va desde la exposición (contaminantes atmosféricos/PAHs) hasta a la enfermedad (cáncer de vejiga). Específicamente, medimos, a largo plazo, la concentración del número total de partículas en Barcelona y en otras cuatro áreas metropolitanas de Europa. Examinamos si la exposición continuada a contaminación atmosférica está asociada con el riesgo de cáncer de vejiga en un estudio caso-control de base hospitalaria en España. En el mismo, investigamos la relación entre los aductos voluminosos de ADN-PAHs en células mononucleares de sangre periférica y el cáncer de vejiga en

individuos no fumadores. Adicionalmente, estudiamos la asociación entre la formación de aductos de ADN y algunos indicadores de contaminación atmosférica. Finalmente, evaluamos la influencia de las variantes genéticas comunes en la vía de reparación del ADN por eliminación de nucleótidos en el riesgo de cáncer de vejiga.

## MÉTODOS

Las medidas de las partículas ultrafinas se llevaron a cabo en Augsburg, Barcelona, Helsinki, Roma, y Estocolmo utilizando el mismo instrumento, un contador de partículas por condensación (TSI modelo 3022), enmarcado dentro del estudio Efectos sobre la Salud de la Contaminación Atmosférica en Subpoblaciones Susceptibles - Health Effects of Air Pollution on Susceptible Subpopulations (HEAPSS).

El estudio Español de Cáncer de Vejiga (Spanish Bladder Cancer en adelante) es un estudio caso-control en España que incluye 1219 casos incidentes de cáncer de vejiga y 1271 controles hospitalarios. Se recogió información sobre la historia residencial incluyendo diversos indicadores de la exposición a contaminación atmosférica y otros factores de riesgo potenciales en una entrevista personal informatizada cara a cara. Se llevó a cabo una revisión sistemática de la literatura para evaluar si los niveles de metabolitos del pireno y los aductos de ADN y de proteínas se correlacionaban con niveles bajos de exposición a PAHs. La revisión sistemática identificó 35 estudios con más de 10 individuos que evaluaban contaminación atmosférica a PAHs en relación con metabolitos de PAHs, principalmente hidroxipireno (1-OHP), aductos de ADN-PAHs o aductos en proteínas.

También se midieron los niveles de aductos de ADN en un subgrupo de individuos del Estudio Spanish Bladder Cancer que estaba compuesto por 76 casos no fumadores y 76 controles emparejados individualmente por sexo, región de residencia, edad y hábito de fumar (ex-fumadores o no fumadores). Para maximizar la relevancia de la medida de aductos de ADN como indicador de la exposición a PAHs, los individuos se seleccionaron entre aquellos que no habían cambiado la residencia, el trabajo ni ninguno de sus estilos de vida principales durante los últimos 10 años. Los aductos voluminosos de ADN se midieron con la técnica del radio-etiquetaje con fósforo-32, tratamiento de la nucleasa P1.

Analizamos 22 polimorfismos en un único nucleótido (Single Nucleotide Polymorphisms – SNP de ahora en adelante) en siete genes de la vía de reparación del ADN por eliminación de nucleótidos (XPC, RAD23B, ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5, y ERCC6). La genotipación se hizo en aquellos sujetos de los que se había podido obtener ADN, que fueron un total de 1150 casos y 1149 controles del Estudio Spanish Bladder Cancer. Los Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) fueron determinados utilizando los ensayos de Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) o Golden Gate (Illumina, San Diego, CA). Los SNPs se seleccionaron favoreciendo los SNPs no sinónimos, aquellos que se habían evaluado anteriormente en relación con el riesgo de cáncer de vejiga urinaria o aquellos que presentaban evidencias de significación funcional.

## RESULTADOS

Del estudio HEAPSS, los resultados muestran que en todas las ciudades estudiadas, las concentraciones de partículas ultrafinas en invierno son mayores que en verano. En Roma y en Barcelona, los inviernos están más contaminados comparado con el verano por un factor entre 4 y 10. El máximo del invierno tanto en Roma como en Barcelona está cerca de  $100.000 \text{ cm}^{-3}$ , mientras que el mínimo en verano es  $>10.000 \text{ cm}^{-3}$ . La máxima diaria en Helsinki y Estocolmo es parecida o casi más baja que la mínima diaria de las ciudades más contaminadas. Las concentraciones entre estos dos grupos de ciudades se diferencia por un factor aproximado de cinco durante todo el día.

Del estudio Spanish Bladder Cancer sobre contaminación atmosférica y cáncer de vejiga, los resultados muestran que vivir más de 40 años en una ciudad con más de 100.000 habitantes está asociado con un incremento del riesgo de cáncer de vejiga en conjunto (OR=1.30, CI 1.04-1.63). Las emisiones de PAHs y gasoil de las industrias situadas cerca del lugar de residencia, evaluadas por expertos, estaban asociadas con un incremento del riesgo (OR=1.29, 0.85-1.98), mientras que no se observó exceso de riesgo o el observado era menor para las otras variables de contaminación. Las razones de odds entre no fumadores tendía a ser más altas que las de fumadores.

Los metabolitos de PAHs y, en menor medida, los aductos de ADN-PAHs se correlacionan bien a nivel de grupo con la exposición a benzo(a)pireno incluso a niveles bajos de contaminación atmosférica. Se encontró una correlación

estadísticamente significativa entre los valores medios de benzo(a)pireno transformados logarítmicamente y los valores medios transformados logarítmicamente de 1-hidroxipireno (coeficiente de correlación de Pearson,  $r=0.76$ ;  $p=0.001$ ), en base a 17 parejas de datos de benzo(a)pireno y 1-hidroxipireno. La correlación entre estudios que utilizaron la media de benzo(a)pireno procedente de medidas estacionarias y la media de aductos de ADN era significativa con un coeficiente de correlación de Pearson de 0.60 ( $p=0.038$ ) en base a 12 parejas de datos transformados logarítmicamente de benzo(a)pireno y aductos procedentes de 3 estudios.

En nuestra evaluación de los aductos voluminosos de ADN en individuos del estudio Spanish Bladder Cancer, el porcentaje de aductos detectables era mayor en controles (41%) que en casos (32%) con una OR de 0.75 (95% CI 0.36-1.58). En un análisis limitado a los controles, se encontró un porcentaje más alto de aductos de ADN entre los cuales su última residencia fue una gran ciudad (50%) comparado con los que vivieron en pueblos (19%);  $p$ -valor=0.04. No se encontraron asociaciones consistentes con ningún otro indicador de contaminación atmosférica.

Individuos con el genotipo variante para SNPs en cuatro de los siete genes evaluados presentaban pequeños incrementos del riesgo de cáncer de vejiga comparado con individuos con el genotipo homocigoto salvaje: RAD23B IVS5-15A>G (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.5;  $P = 0.01$ ), ERCC2 R156R (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.6;  $P = 0.006$ ), ERCC1 IVS5+33A>C (OR, 1.2; 95% CI, 1.0-1.5;  $P = 0.06$ ;  $P$ -tendencia = 0.04), y ERCC5 M254V (OR, 1.4; 95% CI, 1.0-2.0;  $P = 0.04$ ). Un análisis global de los efectos de la vía indicaba que la variación genética en la vía de reparación del ADN por eliminación de nucleótidos caracterizada por los 22 SNPs analizados predice significativamente el riesgo de cáncer de vejiga ( $P = 0.04$ ). Comparaciones de parejas sugirieron que ser portador de variantes en dos genes puede resultar en un incremento substancial del riesgo.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Del estudio HEAPSS, podemos concluir que Barcelona y las otras ciudades sur europeas están más contaminadas que las ciudades norte europeas. Las asociaciones encontradas entre los diferentes indicadores de contaminación atmosférica y el cáncer

de vejiga en el estudio Spanish Bladder Cancer son de pequeñas a moderadas. Sugieren un exceso de riesgo pero se necesita una evaluación posterior en otros escenarios para confirmar-lo. El uso de biomarcadores tendría que ser implementado ampliamente en combinación con técnicas más tradicionales para la evaluación de la población general de la exposición a PAHs procedentes de la contaminación atmosférica.

En este estudio entre no fumadores con estilos de vida y ambientales estables, los aductos voluminosos de ADN no se asociaron al riesgo de cáncer de vejiga. Los resultados no apoyan una asociación del riesgo de cáncer de vejiga con niveles bajos de exposición a PAHs, medidos a través de la formación de aductos voluminosos de ADN en células mononucleares de sangre periférica. Los resultados del análisis genético apoyan la influencia de la variación genética en el cáncer de vejiga urinaria.

En conjunto, esta tesis estudia el riesgo de cáncer de vejiga en asociación con contaminantes atmosféricos incluyendo PAHs que han estado asociados con cáncer de vejiga en escenarios donde la exposición era elevada. Los niveles de contaminación atmosférica en Barcelona son muy elevados, pero la asociación que se observa con los indicadores de contaminación atmosférica utilizados es baja. Aún así, la tendencia positiva y de confirmarse, nos enfrentamos a un gran problema de salud pública. Los aductos voluminosos de ADN para a niveles bajos de exposición a PAHs no se asocian al riesgo de cáncer de vejiga, pero sí que hay una indicación de asociarse a algún indicador de contaminación atmosférica. Es necesario confirmar estos resultados teniendo en cuenta las otras vías de exposición a PAHs y los polimorfismos en los genes implicados en la reparación de este daño en el ADN.





## ABSTRACT

### INTRODUCTION & OBJECTIVES

Air pollution has been associated with several adverse health effects including an increased risk for lung cancer. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are air pollutants that can be present in the air we breathe, usually adhered to particles. In the occupational environment, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) has been associated with an increased risk of bladder cancer. There is much less evidence on environmental exposure to PAHs and other air-contaminants and bladder cancer risk. Metabolites of pyrene, one of the components of the PAHs, and DNA adducts have been used as biomarkers of high-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Nucleotide excision repair (NER) is a critical process for protecting against damage from carcinogens forming DNA adducts, such as PAHs. Functional studies in humans have shown that common variation in NER genes can affect the capacity to repair DNA, and epidemiologic studies have provided some evidence supporting their role in the pathogenesis of smoking-related cancers.

The aim of this thesis is to evaluate the different steps in the pathway from exposure (air-contaminants/PAHs) to disease (bladder cancer). Specifically, we have measured long-term aerosol particle total number concentration measurements in Barcelona and four other metropolitan areas across Europe. We examined whether long term air pollution is associated with bladder cancer risk in a large hospital-based case-control study in Spain. In the same study, we investigated the relation between bulky PAH-DNA adducts in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bladder cancer in non-smoking subjects. Additionally, we examined the association between DNA adduct formation and several air pollution proxies. Finally, we evaluated the influence of common genetic variation in the NER pathway on bladder cancer risk.

## METHODS

The measurements of ultrafine particles were carried out in Augsburg, Barcelona, Helsinki, Rome, and Stockholm using the same instrument, a condensation particle counter (TSI model 3022), within the Health Effects of Air Pollution on Susceptible Subpopulations (HEAPSS) Study.

The Spanish Bladder Cancer study is a case-control study in Spain that included 1219 incident bladder cancer cases and 1271 hospital controls. Information on residential history including several indicators of exposure to air pollution and to other potential risk factors was collected in a face-to-face computerized personal interview. A systematic literature review was performed to evaluate whether levels of metabolites of pyrene and of DNA and protein adducts are correlated to low level environmental exposure to PAHs. The systematic review identified 35 studies with more than 10 subjects that evaluated environmental air pollution to PAHs in relation to metabolites of PAHs, mainly hydroxypyrene (1-OHP), PAH-DNA adducts or protein adducts.

Also we measured the DNA adduct levels in a subgroup of subjects from the Spanish Bladder Cancer study comprised of 76 non-smoking cases and 76 individually matched controls by sex, region of residence, age, and smoking status (never, former). To maximize the relevance of the DNA adduct measurement as a proxy of PAH-exposure, subjects were selected among those who had not changed residence, occupation and major lifestyle factors during the last 10 years. Bulky DNA adducts were measured using the <sup>32</sup>P-postlabeling technique, nuclease P1 treatment.

We analyzed 22 single nucleotide polymorphisms (SNP) in seven NER genes (XPC, RAD23B, ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5, and ERCC6). Genotyping was done for those subjects where DNA was available, to a total of 1,150 cases and 1,149 control subjects from the Spanish Bladder Cancer Study. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were determined using Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) or Golden Gate (Illumina, San Diego, CA) assays. SNPs were selected favoring nonsynonymous SNPs, those evaluated previously in relation to bladder cancer risk or those with evidence for functional significance.

## RESULTS

From the HEAPSS study, the results show that in all of the studied cities, the winter concentrations are higher than the summer concentrations. In Rome and in Barcelona, the winters are more polluted compared with summers by as much as a factor of 4-10. The winter maximum in both Rome and Barcelona is close to 100,000 cm<sup>-3</sup>, whereas the summer minimum is >10,000 cm<sup>-3</sup>. The daily maxima in Helsinki and Stockholm are close or even lower than the daily minima in the more polluted cities. The concentrations between these two groups of cities are different with a factor of about five during the whole day.

From the Spanish Bladder Cancer study on air pollution and bladder cancer, the results show that living more than 40 years in a city with more than 100,000 population was associated with an increased risk for bladder cancer overall (OR=1.30, CI 1.04-1.63). Emissions of PAHs and diesel from industries near the residence, as evaluated by experts, were associated with an increased risk (OR=1.29, 0.85-1.98), while lower or no excess risks were observed for other pollution-related variables. Odds ratios among never-smokers tended to be higher than those of smokers.

PAH metabolites and, to a less extent, PAH-DNA adducts correlated well at group level with exposure to B(a)P even at low levels of air pollution. A statistically significant correlation was found between the log transformed mean values of B(a)P and log transformed mean values of 1-OHP (Pearson correlation coefficient,  $r=0.76$ ;  $p < 0.001$ ), on the basis of 17 pairs of data of B(a)P and 1-OHP. The correlation between studies using stationary measurement of mean B(a)P in air and reporting mean DNA adducts was significant with a Pearson correlation coefficient of 0.60 ( $p=0.038$ ) on the basis of 12 pairs of log transformed BaP and adducts data from 3 studies.

In our evaluation of bulky DNA adducts in subjects from the Spanish Bladder Cancer study, the percentage of detectable adducts was higher in controls (41%) than in cases (32%) with an OR of 0.75 (95%CI 0.36-1.58). In an analysis limited to controls, a higher percentage of DNA adducts was found among those whose last residence was in a big city (50%) compared to those living in villages (19%);  $p$ -value=0.04. No consistent associations were found for other markers of air pollution.

Subjects with the variant genotypes for SNPs in four of the seven genes evaluated had small increases in bladder cancer risk compared to subjects with the homozygous wild-

type genotypes: RAD23B IVS5-15A>G (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.5; P = 0.01), ERCC2 R156R (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.6; P = 0.006), ERCC1 IVS5+33A>C (OR, 1.2; 95% CI, 1.0-1.5; P = 0.06; Ptrend = 0.04), and ERCC5 M254V (OR, 1.4; 95% CI, 1.0-2.0; P = 0.04). A global test for pathway effects indicated that genetic variation in NER characterized by the 22 SNPs analyzed in this study significantly predicts bladder cancer risk (P = 0.04). Pairwise comparisons suggested that carrying variants in two genes could result in substantial increases in risk.

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

From the HEAPSS study, we can conclude that Barcelona and other South European cities are more polluted than North European cities. The small to moderate positive associations found for several indices of air-pollution and bladder cancer in the Spanish Bladder Cancer study, while suggestive of an excess risk, require further evaluation in other settings.

The use of biomarkers should be more widely implemented in combination with more traditional techniques for the assessment of general population exposure to PAHs from ambient air pollution.

In this study among non-smokers with stable environmental and lifestyle factors, bulky DNA adducts were not associated with bladder cancer risk. Results do not support an association of bladder cancer risk with low level exposure to PAHs, as measured through the formation of bulky DNA adducts in peripheral mononuclear cells. Findings from the genetic analyses provide support for the influence of genetic variation in NER on bladder cancer risk.

Overall, this thesis examined bladder cancer risk in association with air-pollutants including PAHs that have been associated with bladder cancer risk at settings of high exposure. Findings from this thesis indicate that air pollution levels in Barcelona are very high, but the association with bladder cancer risk with the air pollution indices we used is moderate. Nevertheless, there is a positive trend, and if confirmed, we are facing an important public health problem. Bulky DNA adducts for low levels of PAHs exposure are not associated with an increased risk of bladder cancer, but there exists an

association with some of the air pollution proxies. Further research is needed to confirm these results, considering other exposure pathways of PAHs and genetic polymorphisms in the DNA repair pathway.



# INTRODUCCIÓ

## 1. CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA

Contaminació: Alteració de les propietats d'un medi per incorporació, generalment deguda a l'acció directa o indirecta de l'home, de pertorbacions, materials o radiacions que introdueixen modificacions de l'estructura i la funció dels ecosistemes afectats (Gran Diccionari de la Llengua Catalana(, 1999). Atmosfera: Capa gasosa que envolta la Terra (Gran Diccionari de la Llengua Catalana(, 1999).

Per tant, combinant ambdós conceptes, s'entén per contaminació atmosfèrica la presència a l'aire de substàncies o formes d'energia que impliquin un risc, dany o molèstia a les persones o béns de qualsevol naturalesa.

Les substàncies contaminants provenen d'una font d'emissió, es transporten per l'atmosfera i finalment afecten als receptors, com les persones o els animals, en el procés anomenat immissió. Els nivells d'immissió varien segons les fonts emissores, i els processos intermedis, com ara la dispersió, el transport, la transformació química.

Les principals fonts d'emissió són d'origen antropogènic: el transport, els fums de fàbriques i indústries i les emissions provinents dels habitatges (calefaccions, emissió de fums de cocció, etc). També hi ha fonts naturals que emeten contaminants, com per exemple, els volcans o els incendis. Però són, en general, emissions de caràcter puntual i que poques vegades afecten a la població en el nostre entorn.

La qualitat de l'aire es mesura segons els nivells d'immissió, és a dir, els nivells de contaminants mesurats en un punt determinat, independentment de la font d'on prové. Hi ha varis paràmetres fixats per la legislació vigent que les administracions corresponents mesuren de manera periòdica. Entre els contaminants comunament mesurats trobem matèria particulada, com PM10, i també gasos, com NO2 i CO. Els PAHs són també contaminants de l'aire i que no es mesuren de manera rutinària.



Les partícules es classifiquen segons la seva mida. Les partícules amb un diàmetre inferior a 10 µm són les PM10, les de diàmetre inferior a 2.5 µm són les PM2.5 i les de diàmetre inferior a 0.1 micres, són les anomenades ultrafines. Aquestes últimes són generades per la nucleació i condensació, majoritàriament provinents de fonts de combustió. N'hi ha moltes en número, però la seva massa és petita (Junker et al., 2000). Són inestables, per tant, pateixen processos secundaris de transformació, com la coagulació o la condensació, que deriven en formació de partícules més grans, de 0.1 a 1 micròmetre. La composició d'aquestes partícules és variable, però generalment es troben sulfats, nitrats i carboni elemental i orgànic -PAHs (Katsouyanni, 2003).

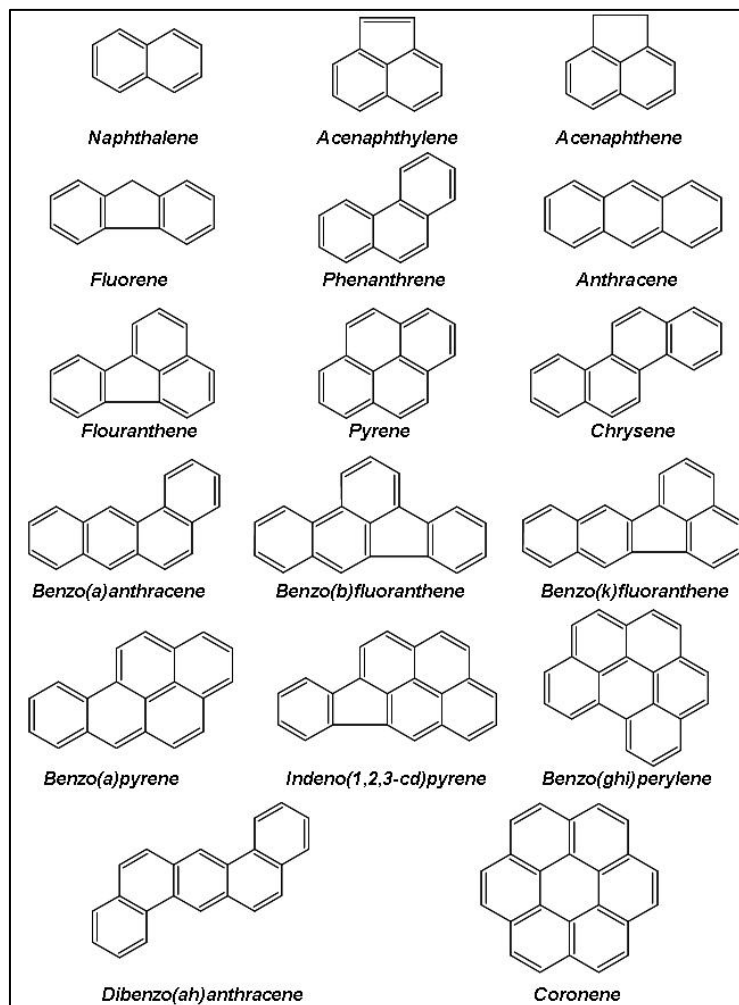
## 2. HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs)

Els PAHs són subproductes de la combustió incompleta de matèria orgànica que es troben ubiqüament distribuïts pel medi atmosfèric. Són compostos formats per tres o més anells benzènics (figura 1), cosa que els infereix una gran estabilitat química. Donades les seves propietats físico-químiques, els PAHs alliberats a l'atmosfera, o bé condensen en partícules de l'aire ja existents o formen partícules per ells mateixos (Mumtaz et al., 1996). Les principals fonts d'emissió a l'atmosfera específiques per a PAHs són el tràfic rodat, els sistemes de calefacció de les llars, el fum del tabac i algunes emissions industrials (Peluso et al., 1998).

La contaminació atmosfèrica no és la única font per la qual podem estar exposats a PAHs. Altres fonts que hi contribueixen són el tabac, tant actiu com passiu, la dieta i algunes activitats laborals (Jongeneelen, 1997).

Els PAHs són compostos ubics al medi ambient. En població fumadora, la principal font d'exposició a PAHs és el tabac. En població no fumadora i no exposada a PAHs a la feina, la dieta es considera la principal font d'exposició (Straif et al., 2005). La contaminació atmosfèrica és una altra de les fonts d'exposició, degut a les emissions industrials, de vehicles i dels sistemes de calefacció de les llars. Altres fonts amb menor importància són els medicaments.

Figura 1. Estructura d'alguns hidrocarburs aromàtics policíclics



Els nivells d'exposició varien molt segons la font d'exposició. En algunes ocupacions, es poden arribar a mesurar nivells tant alts com  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de benzo(a)pirè en aire, tal i com en la indústria de la producció d'alumini o del quitrà (Boffetta et al., 1997; Tremblay et al., 1995). Altres ocupacions tenen nivells més baixos, menor de  $0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de benzo(a)pirè; aquestes ocupacions considerades amb baixa exposició a PAHs poden incloure conductors de camions i autobusos, mecànics de tallers de reparació de vehicles i miners subterranis.

Pel què fa als nivells que trobem en aire degut a la contaminació atmosfèrica són semblants als nivells registrats en ambients laborals que tenen baixa exposició a PAHs. A la ciutat de Barcelona, el nivell de BaP mesurat a l'aire durant l'hivern de 1990 va ser

de  $6.5 \text{ ng/m}^3$  [ $0.0065 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ ], amb una concentració del total de PAHs que arribava a  $69 \text{ ng/m}^3$  [ $0.069 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ ] (Bayona et al., 1994).

En ambients interiors, també podem estar exposats a PAHs, a través dels sistemes de calefacció i del fum passiu. En un estudi realitzat a Xina (Mumford et al., 1993) on fan servir carbó per a cuinar i escalfar l'ambient, a les cases que no tenien xemeneia es van arribar a mesurar nivells de BaP fins a  $383 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ , considerat un nivell molt alt. En un altre estudi a Polònia, s'han mesurat nivells més baixos, de 40 a  $65 \text{ ng/m}^3$  (Siwinska et al., 1999).

Les rutes per les quals estem exposats a PAHs són tres: inhalació dels compostos, ingestió o contacte dèrmic. La inhalació està modulada pel tipus i mida de les partícules a les que els PAHs estan adsorbits (Creasia et al., 1976), amb un temps de vida mitjana que varia entre 1.5 hores en cristalls fins a 5 dies en partícules de carbó de 0.5 a 1 micra de diàmetre. Pel què fa a la ingestió, la principal font són les fruites i verdures contaminades i els cereals, excepte en persones que tenen una ingesta molt elevada de carn preparada en contacte directa amb el foc, on es generen PAHs degut a la combustió (Phillips, 1999). S'estima que la ingesta diària de BaP degut a la dieta és de  $0.5 \text{ }\mu\text{g}$  (Scherer et al., 2000).

Respecte al fum passiu, la quantitat diària de BaP absorbida és de  $1.8 \text{ ng}$ , que representa un 1% de la ingesta total en no fumadors, assumint una exposició diària de 3 hores (Scherer et al., 2000). Degut a la contaminació atmosfèrica podem absorbir de 1 a  $10 \text{ ng/dia}$  de BaP.

S'estima que la ingesta total de PAHs diària tenint en compte totes les rutes d'exposició és de  $3 \text{ }\mu\text{g}$  (Mumtaz et al., 1996).

### 3. EFECTES SOBRE SALUT

En aquest apartat es resumeixen els efectes de la contaminació atmosfèrica sobre la salut, tant a curt com a llarg termini. En un tercer apartat, es resumeixen les evidències

sobre els efectes de l'exposició a PAHs, que són un dels components de la contaminació atmosfèrica més importants en relació amb el càncer.

#### **a. Efectes a curt termini**

Varis estudis han observat efectes adversos sobre la salut de l'exposició a curt termini a la contaminació atmosfèrica.

Un dels primers i més coneguts episodis de la història del què es té constància dels efectes de la contaminació atmosfèrica sobre la salut de les persones va ser el de l'"smog" londinenc, el desembre de l'any 1952. S'estima que altes concentracions de diòxid de sofre i fums negres a la ciutat britànica van causar un excés d'aproximadament 4000 morts, tot i que un re-anàlisi posterior de les dades apunta que l'excés va ser al voltant de 12 000, ja que les conseqüències es poden comptar fins a mesos després del pic de contaminació a l'aire (Bell and Davis, 2001).

Hi ha molts estudis i revisions a la literatura científica dels efectes a curt termini (Brunekreef and Holgate, 2002). Els més estudiats són relacionats amb efectes respiratoris i cardiovasculars. A l'estudi europeu APHEA 2 es va observar un increment de l'1% (0.4-1.5) dels ingressos hospitalaris per malaltia pulmonar obstructiva crònica i asma degut a una exposició a PM<sub>10</sub>. També un augment dels ingressos per malaltia cardiovascular relacionat amb partícules de diàmetre inferior a 10 micres i fums negres (Atkinson et al., 2001). Unes xifres similar es van observar també en un estudi a Estats Units (Zanobetti et al., 2000), amb increments mitjans del 2.54% (SE 0.36) en admissions hospitalàries per MPOC , i del 1.27 % (SE 0.11) per malalties cardiovasculars.

En estudis per ingressos hospitalaris per malalties respiratòries, la relació dels efectes a curt termini està més ben establerta en relació amb les partícules grans (partícules entre PM<sub>10</sub> i PM<sub>2.5</sub>) respecte les partícules fines (entre PM<sub>2.5</sub> i PM<sub>0.1</sub>) (Brunekreef and Forsberg, 2005).

#### **b. Efectes a llarg termini**

Sense menysprear els efectes a curt termini, cal tenir en compte que l'exposició continuada durant la vida a contaminació atmosfèrica també pot tenir conseqüències en la salut a llarg termini (Katsouyanni and Pershagen, 1997). Aquesta hipòtesi va

agafar força al observar que existien diferències de mortalitat per càncer de pulmó i malaltia pulmonar obstructiva crònica segons si el lloc de residència era urbà o rural (Lambert and Reid, 1970).

(Dockery et al., 1993) en un estudi de cohorts anomenat *Six Cities Study* va observar que les taxes de mortalitat específiques per a cadascuna de les 6 ciutats incloses a l'estudi estava associada amb els nivells mitjans de contaminació atmosfèrica, associació més marcada per a  $PM_{2.5}$ ,  $PM_{10}$  i partícules de sulfat. L'efecte més significatiu es va observar per la mortalitat deguda al càncer de pulmó, avaluant d'aquesta manera els efectes a llarg termini de l'exposició a contaminació atmosfèrica. Altres causes específiques de mortalitat no van poder ser avaluades degut al baix poder estadístic. Altres estudis, bàsicament fets a Estats Units, han confirmat aquestes troballes. Un augment de  $10 \mu\text{g}$  de partícules fines (o  $PM_{2.5}$ ) en el American Cancer Society Study suposava un augment del 4% en la mortalitat per totes les causes i un 8% per a càncer de pulmó (Pope, III et al., 2002). Finalment, l'estudi ASHMOG (Adventist Health Study of Smog) també va observar una associació estadísticament significativa per a mortalitat per càncer de pulmó per a partícules  $PM_{10}$ , però només en homes (Abbey et al., 1999).

Tots aquests estudis estimen l'exposició individual a partir de mesures de contaminació preses a un o varis punts de mostreig de la ciutat (Abbey et al., 1999; Dockery et al., 1993; Pope, III et al., 2002), moltes vegades sense tenir en compte un període d'exposició coherent segons l'etiologia de la malaltia i sense fer una avaluació de l'exposició individual acurada, que inclouria patrons d'activitat temporal i la distribució geogràfica de contaminants a petita escala (Katsouyanni and Pershagen, 1997). Més recentment, s'han incorporat els sistemes d'informació geogràfica (SIG) en l'avaluació de l'exposició amb l'objectiu d'estimar uns nivells individuals més acurats (Bellander et al., 2001; Gehring et al., 2006; Hoek et al., 2001; Hoek et al., 2002). També estudis sobre càncer i efectes reproductius han incorporat biomarcadors (Vineis and Perera, 2000). La OMS va organitzar l'any 2002 una reunió d'experts per tal d'analitzar la situació pel què fa a l'avaluació de l'exposició en estudis d'efectes crònics deguts a l'exposició a contaminació atmosfèrica, conclouent amb una sèrie de recomanacions per aquests estudis (, 2003).

Tenint en compte els nivells d'urbanització en lloc de mesures objectives dels nivells de contaminació atmosfèrica, un estudi de l'any 1978 va apuntar que el major nivell d'urbanització incrementa la taxa de mortalitat per càncer de bufeta (Blot and Fraumeni, Jr., 1978). Des de llavors, pocs estudis han aprofundit en el tema. Un estudi més recent a Itàlia observa un excés de mortalitat per càncer de bufeta degut a la urbanització, tant per homes com per dones (Uccelli et al., 2000).

Una altra hipòtesi que reforça l'associació dels efectes adversos en la salut a llarg termini és que la identificació de substàncies carcinògenes en l'aire (Pennanen et al., 2007). Els estudis fets fins al moment no presenten nivells de compostos carcinògens.

### **c. Efectes de l'exposició a PAHs**

Pocs estudis han avaluat els efectes en la salut de la contaminació atmosfèrica que conté PAHs. El risc de càncer degut a l'exposició a nivells de baixos a moderats de contaminació atmosfèrica no pot ser estudiat amb els models epidemiològics clàssics, cal incorporar biomarcadors (Georgiadis and Kyrtopoulos, 1999).

La relació de l'exposició a PAHs i efectes sobre la salut s'observa per a exposicions ocupacionals, amb uns nivells d'exposició elevats (Kogevinas et al., 2003).

L'Agència Internacional d'Investigació sobre Càncer (IARC en el seu acrònim en anglès) avalua la carcinogeneïtat dels PAHs, tant els compostos individuals com les mescles complexes. En la seva última avaluació de l'any 2006 (International Agency for Research on Cancer, 1983; International Agency for Research on Cancer, 1984a; International Agency for Research on Cancer, 1984b; International Agency for Research on Cancer, 1985; International Agency for Research on Cancer, 1987; International Agency for Research on Cancer, 2007), classifiquen ocupacions com treballadors en forns de coc (derivat del carbó), producció d'alumini i treballadors del quitrà entre altres, com a carcinògenes per als humans. Aquesta avaluació també inclou l'estudi de compostos individuals com ara el benzo(a)pirè, l'únic compost individual classificat al grup 1, carcinogen per als humans. Catorze compostos més estan classificats en els grups 2A i 2B com a probables o possibles carcinògens humans, respectivament. I una llarga llista més de compostos que no és poden classificar segons la seva carcinogeneïtat en humans. El tabac, com a mescla complexa de PAHs i molts altres compostos, també ha estat objectiu d'avaluació per part de la IARC, classificant-lo en el

grup 1 (International Agency for Research on Cancer, 1998; International Agency for Research on Cancer, 2004). D'altra banda, el departament de salut del govern d'Estats Units fa una avaluació semblant de compostos carcinògens dins el seu Programa Nacional de Toxicologia. De 15 compostos avaluats conjuntament, conclou que es preveu de manera raonable que aquests PAHs siguin carcinògens per als humans (National Toxicology Program, 2007). Un dels principals problemes en l'avaluació del nivell de carcinogeneïtat és que aquests compostos es presenten en mescles, i que les mescles no són sempre de la mateixa composició ni concentració. Tot això en dificulta l'estudi.

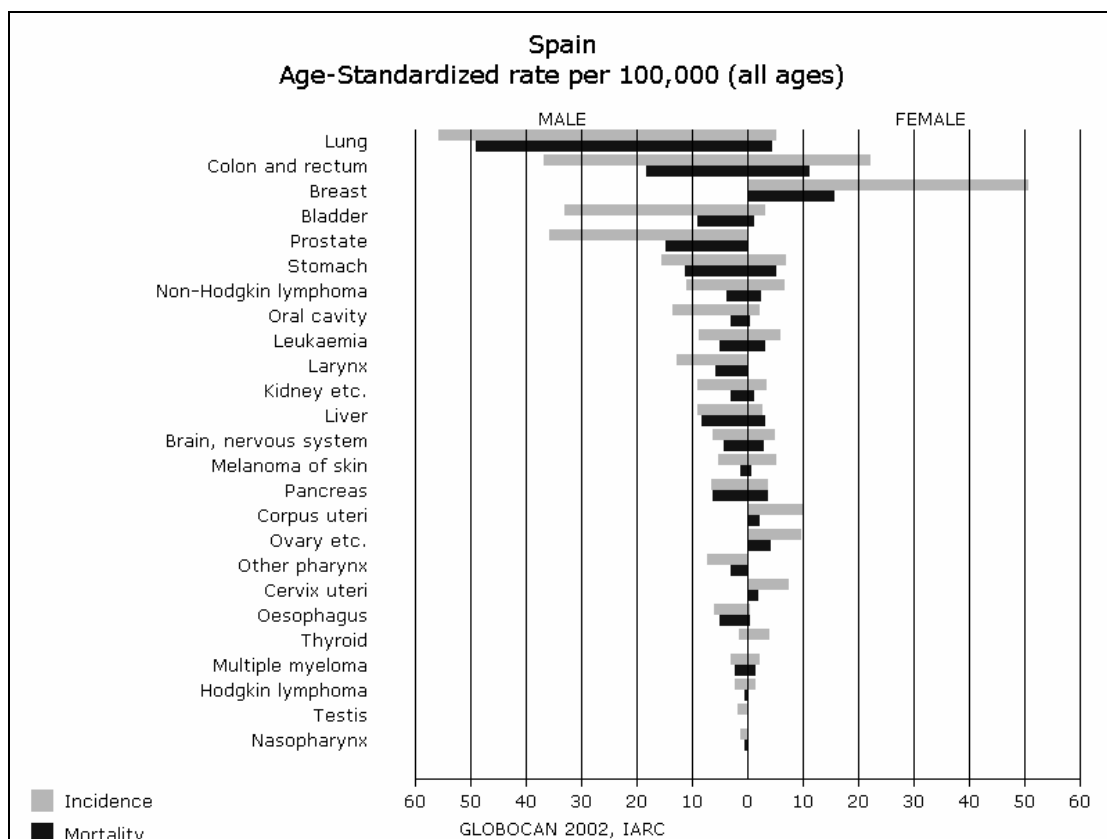
També hi ha estudis sobre la genotoxicitat i embriotoxicitat en animals (Binkova et al., 1999). S'exposa als animals a una sèrie de contaminants atmosfèrics extrets a partir de les partícules recollides de 2 ciutats de la República Txeca. En unes anàlisis *in-vitro* es van observar nivells elevats d'aductes d'ADN, especialment degut a l'exposició a PAHs; als embrions també es van observar defectes al cor i a la paret abdominal. Els PAHs són els components que van mostrar una embriotoxicitat més elevada dels contaminants estudiats. En un estudi dut a terme a Polònia (Perera et al., 1999) es va observar que els nivells de PM<sub>10</sub> estaven correlacionats amb el nivell d'aductes d'ADN mesurats en cèl·lules blanques de sang de mares i sang de cordó umbilicals. Els nounats que presentaven nivells elevats d'aductes també presentaven de manera significativa menor pes al néixer, menor talla i menor circumferència cranial, paràmetres de creixement i desenvolupament fetal. Una conclusió molt important de l'estudi és que els aductes d'ADN passen a través de la placenta de mares a fills, i que els nivells d'aductes trobats en nounats és major que els nivells de les mares; així, el fetus és més sensible al dany que la mare.

#### 4. CÀNCER DE BUFETA URINÀRIA

El càncer de bufeta urinària a Espanya té una incidència estandarditzada per edat per homes i dones de 33.0 i 3.5 per 100 000 persones, respectivament, la segona taxa d'incidència més elevada per homes de tots els països amb registre de càncer al món

(Ferlay et al., 2004). Entre tots els càncers, el de bufeta és el quart més freqüent en homes espanyols (figura 2), produint-se al voltant de 10700 casos/any i amb una mortalitat aproximada de 3300 persones.

Figura 2. Taxes d'incidència estandarditzades per edat a Espanya de les distintes localitzacions de càncer



Clínicament, la malaltia es presenta en un 70-80% dels casos com a hematúria indolora (Mungan et al., 2000). Un 75% dels tumors es presenten com a superficials, mentre que la resta envaeixen la capa muscular (infiltrants). El càncer de bufeta és una malaltia molt heterogènia pel què fa a la seva història natural: va des de tumors de baix grau histològic i baix risc de progressió, a tumors d'alt grau i amb un alt risc de progressió i mortalitat (Kirkali et al., 2005).



La raó home:dona a Espanya és de 10:1 (Puente et al., 2003), explicada en part degut a les diferències en els hàbits de tabac i les exposicions laborals, els factors de risc més importants per la malaltia (Silverman et al., 2006).

## **Factors de risc**

### *Tabac*

El tabac pot arribar a explicar fins a un 50% dels casos de càncer de bufeta urinària en els països occidentals (Brennan et al., 2000). El risc de patir la malaltia en fumadors és de 2 a 3 vegades superiors que en no fumadors, i hi ha una clara relació dosi-resposta amb la intensitat de fumar (International Agency for Research on Cancer, 1986). A l'estudi Epicuro es va veure un augment del risc encara major, de 7,4 i 5,1 vegades més en homes i dones fumadores respectivament, comparant amb els que mai han fumat (Samanic et al., 2006). Tot i que no se sap quin dels components carcinògens del tabac són els responsables per l'augment del risc de cancer de bufeta, sembla que les amines aromàtiques podrien jugar el paper principal (Vineis and Pirastu, 1997). Això podria explicar el perquè els fumadors de tabac negre, més ric en N-nitrosamines i 2-naftilamina que el tabac ros, tenen un risc una mica més elevat de càncer de bufeta urinària (Momas et al., 1994). Tot i això, aquest no és un resultat consistent amb un altre estudi espanyol que ha utilitzat una metodologia similar (Lopez-Abente et al., 1991)(Lopez-Abente et al, 1991, Am J Epidemiol), on no s'observen diferències.

### *Tabac passiu*

S'han dut a terme pocs estudis avaluant a relació entre tabac passiu i càncer de bufeta urinària. Les troballes fins al moment no troben cap associació (Samanic et al., 2006; Zeegers et al., 2002).

### *Exposicions laborals*

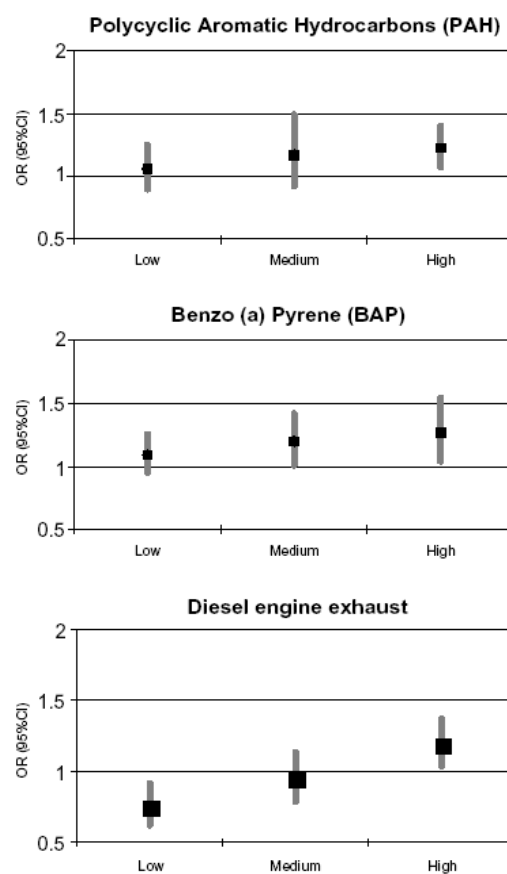
Les exposicions a compostos carcinògens en l'àmbit laboral es consideren el segon factor de risc més important per al càncer de bufeta.

L'estudi de les exposicions laborals associades a un augment del càncer de bufeta es va originar a la dècada dels 50 amb la identificació de possibles riscos en la indústria

anglesa dels tints i del cautxú (Case et al., 1954b; Case and Hosker, 1954a; Case and Pearson, 1954c). A partir d'aquí, s'han identificat més de 40 feines denominades d' "alt risc" (Silverman et al., 2006), tot i que la relació amb la malaltia no ha estat ben definida en la majoria d'elles.

En una avaluació conjunta d'onze estudis cas-control a Europa es va observar un increment en el risc de càncer de bufeta urinària degut a una exposició en l'àmbit laboral a PAHs i benzo(a)pirè (Kogevinas et al., 2003), Figura 3. També es va observar un increment per a treballadors amb elevades exposicions a PAHs en les indústries de la producció d'alumini, la gasificació del carbó, la destil·lació del quitrà.

Figura 3. Raó d'odds per càncer de bufeta en homes europeus per exposició a PAHs, BaP i fums d'emissió diesel, utilitzant una matriu d'exposicions laborals. L'exposició fou evaluada per diferents períodes temporals com a producte de la prevalença d'exposició, per el nivell mitjà d'exposició a cada feina. Els individus exposats estan classificats en tercils d'exposició màxima



al lloc de treball durant la seva història laboral. Els individus no exposats són el grup de referència (adapted from Kogevinas et al 2003).

També cal destacar els treballadors exposats a fums d'emissió de motors dièsel (Boffetta et al., 1997; Silverman et al., 1986), que conté 1-nitropirè, compost classificat com a possiblement carcinogen per la IARC (International Agency for Research on Cancer, 1989).

(Lopez-Abente et al., 2006) en el seu anàlisi de distribució municipal va detectar un augment del risc de càncer de bufeta urinària a la zona del Bages, on hi abunda la indústria del tèxtil. Aquest resultat fou confirmat posteriorment per Serra et al. 2007 (enviat) on mostrava un augment del risc per alguns treballadors en la indústria del tèxtil, com teixidors, treballadors exposats a materials sintètics i els implicats en les tasques de bobinat, ordit i encolat.

#### *Subproductes de la cloració de l'aigua*

Els subproductes de la cloració s'originen degut a la reacció entre la matèria orgànica i el clor afegit per a la desinfecció. És un grup heterogeni de molts compostos, però generalment els trihalometans (THM) s'han agafat com a indicadors del total de la mescla. Hi ha varis estudis associant l'exposició a THMs i el risc de càncer de bufeta urinària. Els estudis inicials tenien en compte només la ingestió (Villanueva et al., 2004), i els més recents ja inclouen altres vies d'exposició com la inhalació o l'absorció dèrmica (Villanueva et al., 2007).

#### *Dieta*

Una dieta rica en fruita i verdura s'ha associat amb un menor risc de càncer de bufeta urinària en la majoria dels estudis que han avaluat aquesta relació (Garcia-Closas et al., 2007). Les amines heterocícliques s'originen durant la cocció de carn i peix a altes temperatures i són mutagèniques i carcinogèniques (International Agency for Research on Cancer, 1993b). L'evidència fins al moment sobre l'augment del risc de càncer amb la ingestió d'aquests compostos és limitada (Augustsson et al., 1999). El consum de cafè

està relacionat amb el consum de tabac, i essent aquest el principal factor de risc per càncer de bufeta, moltes vegades no s'ha pogut discernir si els resultats obtinguts de la relació entre el càncer de bufeta i el consum de cafè està confosa pel tabac. En els estudis que han avaluat dita relació en no fumadors no s'observa un augment clar del risc de patir la malaltia (Sala et al., 2000). Tot i que hi ha evidències en animals que la sacarina augmenta la incidència del càncer de bufeta en rates de segona generació que han estat exposades a l'úter, les evidències epidemiològiques no mostren una associació amb el risc de partir càncer de bufeta.

#### *Ingesta de líquids*

Els resultats dels estudis sobre el consum total de líquids i el càncer de bufeta són inconsistents (Altieri et al., 2003; Zeegers et al., 2004), però un estudi recent mostra una disminució del risc de la malaltia associada amb el consum de fluids (Michaud et al., 2007).

#### *Medicaments*

S'ha observat una reducció significativa del risc de càncer de bufeta urinària per a consumidors habituals d'antiinflamatoris no esteroïdals (AINE) (Fortuny et al., 2006). Aquest resultat és consistent amb estudis anteriors (Castelao et al., 2000; Pommer et al., 1999).

La ciclofosfamida és un agent immunosupressor utilitzat pel tractament de pacients amb limfoma no-Hodgkin que augmenta el risc de càncer de bufeta després del tractament (Pedersen-Bjergaard et al., 1988). No està clar si aquest risc és degut a l'efecte immunosupressor o a les propietats carcinògenes inherents del medicament (Kirkali et al., 2005).

Els barbitúrics també s'han estudiat amb relació amb la malaltia. Un dels barbitúrics més utilitzats, el fenobarbital, es caracteritza per la seva acció de desactivar carcinògens de la bufeta, com el 4-aminobifenil present en el tabac; per tant, s'ha observat una disminució del risc de càncer de bufeta (Olsen et al., 1993).

#### *Tints de cabell*

Feines com perruquers i barbers s'han associat al càncer de bufeta urinària (International Agency for Research on Cancer, 1993a). A partir d'aquí es va hipotetitzar

si la utilització de tints del cabell podria comportar un augment del risc pels als usuaris d'aquest producte. Les evidències fins al moment són contradictòries. Alguns estudis troben un excés de risc per a utilització de tints permanents (Gago-Dominguez et al., 2001), mentre que en altres estudis les associacions són negatives (Kogevinas et al., 2006).

#### *Altres condicions urològiques*

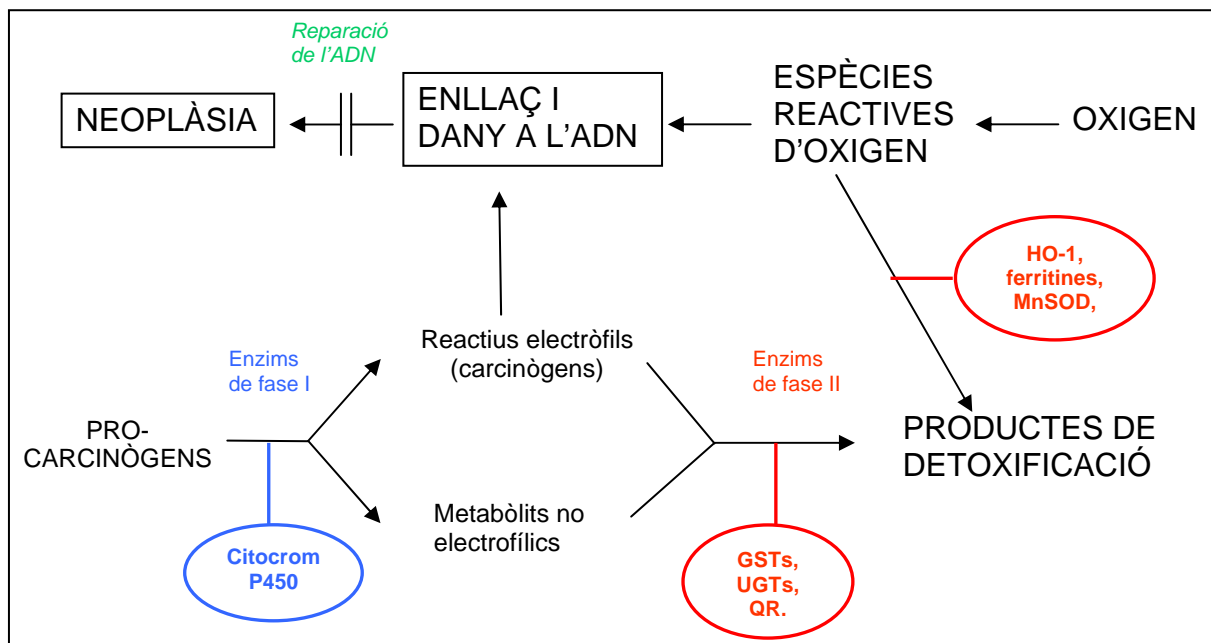
Les infeccions cròniques del tracte urinari s'han associat amb el desenvolupament de càncer de bufeta (Kantor et al., 1984). La infecció per *Schistosoma haematobium* està relacionada amb un augment del càncer de bufeta urinària de tipus escamós. En zones on aquest bacteri es endèmic, la proporció de càncers escamosos és major que la de transicionals (Bedwani et al., 1998).

## 5. ADUCTES I RADIOETIQUETATGE AMB FÒSFOR-32 (<sup>32</sup>P-POSTLABELING)

Un aducte és un enllaç covalent entre una molècula química i una macromolècula biològica, tipus ADN o proteïnes. Aquest enllaç pot produir-se amb el xenobiòtic original que entra al cos, o amb una transformació metabòlica d'aquest. Si aquestes lesions a l'ADN no són reparades pels mecanismes de reparació corresponents, poden resultar en mutacions a llocs crítics del genoma durant la replicació de l'ADN, i en últim terme, donar lloc a càncer, a través d'un procés carcinogènic de varies fases (figura 4) (Gupta, 1993). Per tant, aquests aductes són un pas intermedi en el procés de carcinogènesi química, que s'inicia amb una exposició i finalitza en la malaltia.

L'exposició a PAHs s'ha associat amb nivells d'aductes voluminosos d'ADN (Xue and Warshawsky, 2005), i per tant, com a extensió lògica, també haurien d'estar associats al risc de càncer de bufeta si l'exposició a PAHs està associada amb la malaltia. En un estudi recent, no es va trobar aquest relació, excepte en individus fumadors (Peluso et al., 2005).

Figura 4. Metabolisme general dels carcinògens



El radioetiquetatge amb fòsfor-32, o  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling en denominació anglesa, fa referència a la hidrolització dels nucleòtids d'una cadena d'ADN i el posterior etiquetatge amb fòsfor-32 radioactiu (Gupta et al., 1993). (Gupta et al., 1982) l'any 1982 van aplicar aquesta tècnica en l'anàlisi d'aductes aromàtics d'ADN. Des de llavors, aquesta tècnica, amb posteriors modificacions per a millorar-la, s'ha utilitzat molt donada la seva alta sensibilitat per a detectar i quantificar aductes d'ADN. Una de les avantatges de l'assaig és que no cal conèixer l'estructura dels xenobiòtics, i es poden analitzar mescleres complexes de compostos (Gupta, 1993).

Els passos bàsics de l'assaig són:

1. Extracció i purificació de l'ADN i quantificació acurada del mateix
2. Radio-etiquetatge o Postlabeling amb fòsfor-32
3. Cromatografia de capa fina
4. Identificació radiogràfica dels aductes
5. Quantificació dels aductes

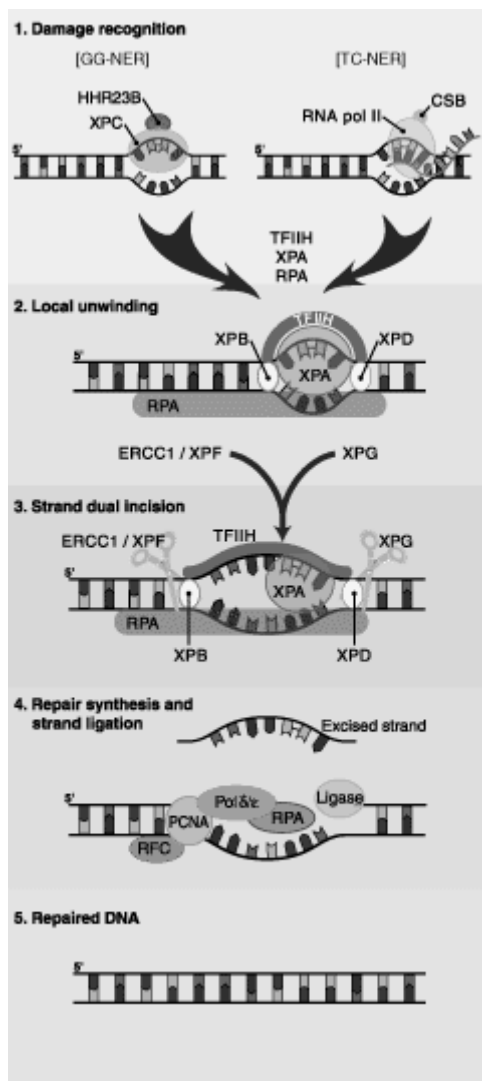
## 6. SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA I CÀNCER DE BUFETA URINÀRIA

La susceptibilitat genètica es defineix com la influència de certs factors genètics en l'etiologia o el desenvolupament d'una malaltia. En el cas de carcinogens, s'han avaluat principalment variacions genètiques en gens que codifiquen per enzims implicats en l'activació o detoxificació dels compostos químics, o també gens implicats en la reparació de l'ADN en el cas que aquests compostos hagin arribat a lligar-se amb aquesta macromol·lècula.

El càncer de bufeta és un dels primers càncers pels quals es va demostrar una interacció entre exposicions ambientals i polimorfismes genètics. Individus amb el gen de la N-acetil transferasa (NAT2) mutat tenen una capacitat reduïda de detoxificar amines aromàtiques (acetiladors lents) i s'ha observat de manera consistent que tenen aproximadament un 40% més de risc de desenvolupar càncer de bufeta. Els acetiladors NAT2 lents tenen un risc relatiu més alt degut al tabac que les acetiladors NAT2 ràpids. S'han trobat resultats consistents també pel gen GSTM1 que codifica per la glutatió S-transferasa M1, un enzim involucrat en la detoxificació d'una gran varietat de carcinògens. Individus amb el genotip GSTM1 nul tenen un major risc de càncer de bufeta (Garcia-Closas et al., 2005). Les associacions Les associacions entre altres variants de gens metabolitzadors i càncer de bufeta no són consistents. El principal mecanisme de reparació de l'ADN per a reparar aductes voluminosos de compostos químics produïts per amines aromàtiques i altres carcinògens del tabac és la via de reparació per eliminació de nucleòtids, i varis estudis suggereixen que la variació genètica en aquesta via pot afectar el risc de càncer de bufeta. Hi ha menys evidències sobre polimorfismes implicats en la via de reparació de l'ADN per eliminació de bases, la reparació per trencament de la doble cadena o gens de control del cicle.

Un dels mecanismes de reparació de l'ADN és la via de reparació per excisió de nucleòtids (NER). El NER és probablement la via de reparació de l'ADN més flexible, ja que actua en una gran diversitat de lesions del material genètic, entre les quals es troben els aductes voluminosos deguts a compostos químics com els PAHs.

Figura 5. Procediment de reparació de l'ADN per eliminació de nucleòtids



1. Reconeixement del dany
2. Descargolament local
3. Incisió dual a la cadena
4. Síntesi de reparació i lligament a la cadena
5. ADN reparat

La reparació del ADN per la via de l'excisió de nucleòtids (NER) és un procés enzimàtic pel qual un tros d'una cadena d'ADN danyada és eliminada i reemplaçada per re-síntesi utilitzant l'altre cadena d'ADN, que no està danyada, com a plantilla. En el procés, una endonucleasa reconeix la deformació de l'ADN, per exemple, deguda a la presència d'un aducte, i fa dos talls a la cadena d'ADN uns quants nucleòtids més endavant i uns quants nucleòtids més enrere del lloc del dany. Així talla el tros d'ADN danyat i aquest és degradat per enzims. La ADN polimerasa utilitza el grup hidroxil en un dels extrems de la cadena principal per a començar a sintetitzar el tros nou d'ADN, i finalment la ADN lligasa ajunta el nou tros sintetitzat a l'antiga cadena, on hi havia el



buit (figura 5). En total, el procés requereix més de 30 proteïnes que actuïn de manera progressiva (Batty and Wood, 2000).

Hi ha varis estudis que han avaluat alguns polimorfismes en alguns dels gens implicats en aquesta via de reparació en relació amb el càncer de bufeta (Matullo et al., 2006; Sak et al., 2006; Sak et al., 2007), però no hi ha estudis que hagin avaluat la via com a global.

## 7. ESTUDI HEAPSS - Health Effects of Air Pollution in Susceptible Subpopulations (Efectes sobre la Salut de la Contaminació Atmosfèrica en Sub-poblacions Susceptibles)

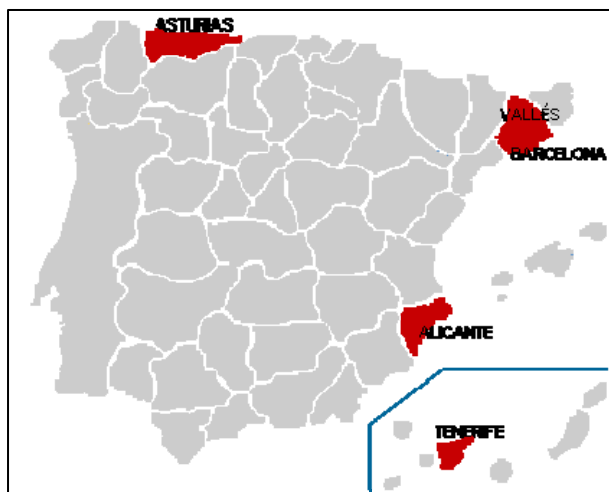
És un estudi finançat per la Unió Europea, sobre els efectes de la contaminació atmosfèrica en la salut cardíaca en cinc ciutats europees (Roma, Helsinki, Augsburg, Stockholm i Barcelona) caracteritzades per diferents qualitats de l'aire i diferents climes. L'objectiu principal és determinar els efectes aguts de la contaminació atmosfèrica deguda a gasos i a matèria particulada en els infarts de miocardi a nivell de població, i en les morts i re-hospitalitzacions en una població susceptible que inclou pacients amb un infart de miocardi previ. Es van recollir dades de contaminació atmosfèrica que es mesuren habitualment a les ciutats, i també es van fer mesures de partícules ultrafines durant un any utilitzant un comptador de partícules per condensació (CPC).

Les dades de contaminació atmosfèrica recollides per a cada ciutat van ser les següents: CO 24-hores, màxim CO de 8-hores, ozó màxim 8-hores, ozó màxim 1-hora, NO<sub>2</sub> 24-hores, NO<sub>2</sub> màxim 1-hora, NO mitjana 24-hores, SO<sub>2</sub> mitjana 24-hores, Fums Negres mitjana 24-hores, Partícules en Suspensió Totals mitjana 24-hores, PM<sub>10</sub> mitjana 24-hores, PM<sub>2.5</sub> mitjana 24-hores. Les variables meteorològiques mesurades van ser: temperatura diària, temperatura de condensació o humitat relativa, pressió baromètrica a nivell del mar, visibilitat de l'aeroport, pluja, neu i velocitat del vent. També es van recollir dades de dies de vacances, esdeveniments inusuals (vagues dels serveis de salut, inundacions, onades de fred o calor, etc), i dies de decrement de població (com per exemple períodes de vacances).

Amb les mesures realitzades de partícules ultrafines, es desenvoluparan models específics per a cada ciutat a partir de les condicions meteorològiques i de contaminació habituals. Aquestes estimacions s'utilitzaran per l'anàlisi dels efectes sobre la salut de les partícules ultrafines per a cobrir tot el període de l'estudi (Paatero et al., 2005).

La part que es presenta en aquesta tesi és la que mesura els nivells de contaminació atmosfèrica, bàsicament partícules ultrafines.

## 8. ESTUDI EPICURO – Spanish Bladder Cancer Study (SBC Study)



És un estudi cas-control que es va dur a terme entre l'any 1998 i 2001 a 18 hospitals d'Espanya repartit en 5 regions: Barcelona, Vallès/Bages, Alacant, Tenerife i Astúries. Es van recollir tots els casos incidents de càncer de bufeta urinària en els hospitals participants que tenien entre 20 i 80 anys, i que al moment del diagnòstic vivien a l'àrea

d'influència de l'hospital. Tots els casos van ser confirmats històlogicament a través d'un panell de patòlegs experts, seguint el criteri de 1998 de la OMS i de la Societat Internacional de Patologia Urològica (Mostofi et al., 1999).

Els controls eren d'origen hospitalari i es van aparellar individualment als casos per edat (marge de 5 anys), gènere, regió i origen ètnic. Els diagnòstics permesos per als controls eren aquells no relacionats amb exposicions d'interès, com el tabac. La distribució dels diagnòstics d'admissió va ser la següent: 37% hernies, 11% altres diagnòstics de cirurgia abdominal, 23%

fractures, 7% altres problemes ortopèdics, 12% hidrocele, 4% trastorns circulatoris, 2% trastorns dermatològics, 1% trastorns oftalmològics, i 3% altres malalties.

A cada subjecte de l'estudi se li va fer una entrevista personalitzada amb l'ajuda d'un ordinador (CAPI- Computer Assisted Personal Interview). L'entrevista recollia informació dels factors de risc, coneguts i potencials, pel càncer de bufeta: dades socio-demogràfiques, tabac i cafè, història ocupacional, història residencial i exposicions ambientals, història mèdica, història familiar, i qualitat de vida. Un 84% dels casos elegibles i 88% dels controls van acceptar participar a l'estudi; d'aquests, un 20% va completar una versió més curta de l'entrevista, el qüestionari d'articles crítics que incloïa la informació essencial. Dels 1219 casos i 1271 controls entrevistats, es va aconseguir una mostra biològica per extreure ADN del 97% dels casos i 92% dels controls, ja sigui a través d'una extracció de sang o una mostra de cèl·lules bucals. Després de l'alta hospitalària, els participants havien d'omplir un qüestionari alimentari i un diari de pH i freqüència urinària.

L'estudi estava coordinat des de Barcelona, i també hi participaven investigadors de l'Institut Nacional de Càncer (NCI) dels Estats Units.

## JUSTIFICACIÓ

La taxa d'incidència del càncer de bufeta urinària a Espanya és la més gran d'Europa en homes (33 per 100.000 habitants) (Ferlay et al., 2004) i el segon amb la mortalitat més alta (9.1 per 100.000 habitants) (Àrea de Epidemiologia Ambiental y Càncer, 2005). La seva supervivència és del 75% en homes i del 70% en dones als 5 anys del diagnòstic. Això fa que la seva prevalença sigui molt elevada, essent un problema important de salut pública. Els factors de risc coneguts per la malaltia no són suficients per explicar aquesta elevada incidència a Espanya.

La contaminació atmosfèrica, bàsicament partícules, s'ha associat amb el risc de patir càncer de pulmó. Els riscos trobats són baixos comparats amb altres factors de risc com el tabac. El problema principal per la salut pública és que hi ha molta gent exposada, per tant, la proporció atribuïble a aquest factor pot ser elevada. D'altra banda, l'exposició a nivells elevats de contaminació atmosfèrica que conté PAHs en àmbits ocupacionals ha estat relacionada amb el càncer de bufeta urinària. Cal comprovar que l'exposició crònica a nivells més baixos de PAHs, tal i com trobem al medi ambient, no pugui donar lloc un efecte semblant.

Donada la gran quantitat d'informació disponible sobre el mecanisme molecular de genotoxicitat de PAHs, ens plantejem la possibilitat d'utilitzar biomarcadors, que poden ser eines més sensibles per a captar tant exposicions i efectes. S'ha demostrat que la susceptibilitat genètica és un factor a tenir en compte en el càncer de bufeta urinària. Per tant, en la temàtica que aborda aquesta tesi sobre exposició a contaminants atmosfèrics i càncer de bufeta urinària es important la utilització de les eines desenvolupades en epidemiologia molecular i genètica.



## OBJECTIUS

### OBJECTIU GENERAL

- Estudiar la relació entre la contaminació atmosfèrica i el càncer de bufeta urinària.

### OBJECTIUS ESPECÍFICS

1. Estudiar la contaminació atmosfèrica a Barcelona i els seus patrons diaris i estacionals.
2. Realitzar una revisió sistemàtica sobre els biomarcadors d'exposició a nivells baixos d'hidrocarburs aromàtics policíclics, especialment metabòlits del pirè i aductes.
3. Estudiar l'associació entre l'exposició a contaminació atmosfèrica, a través d'indicadors, i el càncer de bufeta urinària.
4. Estudiar l'associació entre els nivells d'aductes d'ADN i el càncer de bufeta urinària; Estudiar la relació entre l'exposició a PAHs i el nivell d'aductes voluminosos d'ADN.
5. Estudiar la relació entre una via de reparació de l'ADN, la reparació per excisió de nucleòtids que és la principal via de reparació d'aductes voluminosos d'ADN, i el càncer de bufeta urinària.



---

# METODOLOGIA I RESULTATS

## ARTICLE 1

---

*Aalto P, Hameri K, Paatero P, Kulmala M, Bellander T, Berglind N, Bouso L, Castaño-Vinyals G, Sunyer J, Cattani G, Marconi A, Cyrys J, von Klot S, Peters A, Zetzsche K, Lanki T, Pekkanen J, Nyberg F, Sjovald B, Forastiere F. Aerosol particle number concentration measurements in five European cities using TSI-3022 condensation particle counter over a three-year period during health effects of air pollution on susceptible subpopulations. Journal of the Air & Waste Management Association 2005; 55: 1064-1076*

---

### RESUM

En aquest estudi, es presenten les mesures a llarg termini del nombre de partícules en l'aerosol de cinc àrees metropolitanas d'Europa. Les mesures s'han dut a terme a Augsburg, Barcelona, Helsinki, Roma i Estocolm, utilitzant el mateix instrument, un comptador de partícules per condensació (model TSI 3022). Els resultats mostren que en totes les ciutats estudiades, les concentracions durant l'hivern són superiors a les concentracions durant l'estiu. A Helsinki i Estocolm les concentracions a l'hivern són el doble, i a Augsburg quasi es tripliquen respecte els mesos d'estiu. El màxim de les concentracions mitjanes mensuals registrat en aquestes ciutats està entre 10.000 cm<sup>-3</sup> i 20.000 cm<sup>-3</sup>, mentre que el mínim durant l'estiu és de ~ 5.000-6.000 cm<sup>-3</sup>. A Roma i a Barcelona, els hiverns estan més contaminats comparat amb els estius fins a un factor de 4-10. El màxim de l'hivern tant a Roma com a Barcelona està prop dels 100.000 cm<sup>-3</sup>, mentre que el mínim a l'estiu és > 10.000 cm<sup>-3</sup>. Durant els dies laborables el màxim de la concentració mitjana horària en totes les ciutats es detecta durant el matí, entre les 7 i les 10 h. El màxim al vespre es detecta a Barcelona, Roma i Augsburg, però no és tan pronunciat com al matí. La màxima diària de Helsinki i Estocolm és semblant o fins i tot més baixa que la mínima diària en les ciutats més contaminades. Les concentracions entre aquests dos grups de ciutats són diferents en un factor de cinc aproximadament durant tot el dia. L'estudi remarca la influència de la selecció de lloc de mesura i de la configuració de la línia de mostreig en les concentracions observades.



Podeu consultar l'article a:

Aalto P, Hameri K, Paatero P, Kulmala M, Bellander T, Berglind N, Bouso L, Castaño-Vinyals G, Sunyer J, Cattani G, Marconi A, Cyrus J, von Klot S, Peters A, Zetzsche K, Lanki T, Pekkanen J, Nyberg F, Sjoball B, Forastiere F. [Aerosol particle number concentration measurements in five European cities using TSI-3022 condensation particle counter over a three-year period during health effects of air pollution on susceptible subpopulations.](#) Journal of the Air & Waste Management Association 2005; 55: 1064-1076

## ARTICLE 2

---

*Castaño-Vinyals G, Cantor KP, Malats N, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Rothman N, Vermeulen R, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M. Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain. Occupational and Environmental Medicine 2007, Jul 18 [Epub ahead of print].*

---

## RESUM

**Objectius.** La contaminació atmosfèrica s'ha associat amb un increment del risc de càncer de pulmó. Nosaltres vam examinar si l'exposició de llarga duració a contaminació atmosfèrica s'associa amb el risc de càncer de bufeta.

**Mètodes.** Es va utilitzar informació sobre un estudi cas-control conduït a Espanya que va incloure 1219 casos incidents i 1271 controls hospitalaris. En una entrevista informatitzada cara a cara, es va recollir informació sobre la història residencial, incloent varis indicadors d'exposició a contaminació atmosfèrica i altres potencials factors de risc. Les raons d'odds (OR) i els intervals de confiança del 95% (CI) es van ajustar per edat, sexe, tabac, ocupació, contaminants de l'aigua i dieta.

**Resultats.** Viure en una ciutat durant més de 40 anys amb una població de 100.000 habitants o més estava associat amb un augment de risc de càncer de bufeta (OR=1.30, CI 1.04-1.63). Les emissions de PAHs i fums de gasoil prop de la residència, avaluat per experts, estava associat amb un increment del risc (OR=1.29, 0.85-1.98), mentre que per les altres variables de contaminació es van trobar riscos més baixos o excés de risc inexistent. Les raons d'odds entre els no fumadors tenien tendència a ser més grans que les de fumadors.

**Conclusions.** Les associacions que van de petites a moderades trobades per varis indicadors de contaminació atmosfèrica i càncer de bufeta, tot i que suggestives d'un excés de risc, requereixen una avaluació posterior en altres entorns.

---

**Air pollution and risk of urinary bladder cancer  
in a case-control study in Spain**

---

**Gemma Castaño-Vinyals**

*Centre for Research in Environmental Epidemiology; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain*

**Kenneth P. Cantor**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA*

**Núria Malats**

*Centre for Research in Environmental Epidemiology; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain*

**Adonina Tardon**

*Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain*

**Reina Garcia-Closas**

*Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife, Spain*

**Consol Serra**

*Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; and Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain*

**Alfredo Carrato**

*Hospital General de Elche, Elche, Spain*

**Nathaniel Rothman**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA*

**Roel Vermeulen**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA; and Institute of Risk Assessment Sciences, University of Utrecht, The Netherlands*

**Debra Silverman, Mustafa Dosemeci**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA*

**Manolis Kogevinas**

*Centre for Research in Environmental Epidemiology; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain; and Department of Social Medicine, Medical School, University of Crete. Herakleion, Crete, Greece; and CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain.*

**Keywords:** urinary bladder neoplasms, air pollution, case-control studies, retrospective exposure assessment

---

**ABSTRACT**

**Objectives.** Air pollution has been associated with an increased risk for lung cancer. We examined whether long term air pollution is associated with bladder cancer risk.

**Methods.** Information from a case-control study in Spain that included 1219 incident cases and 1271 hospital controls was used. Information on residential history including several indicators of exposure to air pollution and to other potential risk factors was collected in a face-to-face computerized personal interview. Odds Ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were adjusted for age, gender, region, smoking, occupation, water contaminants and diet.

**Results.** Living more than 40 years in a city with more than 100,000 population was associated with an increased risk for bladder cancer overall (OR=1.30, CI 1.04-1.63). Emissions of PAHs and diesel from industries near the residence, as evaluated by experts, were associated with an increased risk (OR=1.29, 0.85-1.98), while lower or no excess risks were observed for other pollution-related variables. Odds ratios among never-smokers tended to be higher than those of smokers.

**Conclusions.** The small to moderate positive associations found for several indices of air-pollution and bladder cancer, while suggestive of excess risk, require further evaluation in other settings.

## INTRODUCTION

Particulate air pollution has been associated with increased lung cancer mortality in the American Cancer Society Cancer Prevention II study (1). In the EPIC prospective study in Europe, indices for air-pollution such as residential proximity to heavy traffic, have been associated with an increased incidence of lung cancer (2). Several air-pollutants, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and diesel engine exhaust, have been shown to be carcinogenic and have been associated with an increased risk for bladder cancer in the occupational setting (3).

An increased risk of bladder cancer for exposure to total PAHs and benzo(a)pyrene was observed among workers in a pooled analysis of 11 European case-control studies (4) and has been observed among occupations in industries with high exposure to PAHs like aluminum production, coal gasification and tar distillation (5). A higher risk has also been observed for occupations with exposure to diesel motor exhaust, especially truck drivers (3;6). 1-nitropyrene is one of the compounds found in the particulate emissions of diesel engines, and has been classified as possibly carcinogenic to humans by the International Agency for Research on Cancer (7). PAH levels in occupational settings may be, however, considerably higher compared to levels in the ambient air. For example in an aluminum industry in Quebec (8), average exposure to B(a)P in 1970-1988 was 8.5 µg/m<sup>3</sup>. In the city of Barcelona, Spain, the level of BaP sampled in the air during the winter of 1990 reached 6.5ng/m<sup>3</sup> with a total concentration of PAHs of 69 ng/m<sup>3</sup> (9). Among specific PAHs the highest levels observed were for benzo(ghi)perylene. The presence of this compound denotes that gasoline-powered vehicle emissions are among the main sources of PAHs, since it is one of the individual PAHs with highest emission rates from these vehicles (10).

We examined if long-term exposure to air-pollution, particularly industrial emissions and surrogate indices of vehicle emissions, was associated with an increased risk of bladder cancer in the Spanish Bladder Cancer Study. This is one of the first studies to examine risk of bladder cancer and exposure to air pollution.

## METHODS

We recruited 1219 incident bladder cancer cases and 1271 hospital controls between 1998-2001 from 18 hospitals in 5 areas of Spain: Barcelona, Vallès/Bages, Alicante, Tenerife and Asturias (Table 1). Subjects were 21-80 years of age, and lived in the catchment area of the participating hospitals. Cases were histologically confirmed by a panel of expert pathologists that also ensured uniformity of classification criteria, according to the World Health Organization system (11).

Controls were selected from patients admitted to the participating hospital with diseases not *a priori* related to bladder cancer or known risk factor for the disease. The main diagnoses in hospital admissions were hernias (37%), other abdominal surgery (11%), fractures (23%), other orthopedic conditions (7%), hydrocele (12%), circulatory conditions (4%), dermatological conditions (2%) and ophthalmologic conditions (1%). Controls were individually matched to cases on age at interview within 5-year categories, gender, ethnicity, and region of residence at the time of hospital admission. Only 6 subjects were non-Caucasian and not further examined in this analysis. Eighty-four percent of cases and eighty-eight percent of controls completed a face-to-face computer-assisted personal interview (CAPI) that included information about socio-demographic data, smoking, occupational history, lifetime residential history and environmental exposures, medication, family history of cancer and other factors. Nearly all interviews were conducted during the stay of the subjects in the hospital. Twenty percent of the subjects completed a Critical Items questionnaire that was an abbreviated version of the complete interview; it included lifetime residential history but not the specific information on surrogates of air-pollution exposures. Written informed consent was obtained from all patients. The study was approved by the Ethics Committees of all participating institutes.

Several indices were used to assess exposure to air pollution at each residence occupied for more than one year during lifetime: proximity to industries, windows facing traffic and size of the city of residence. Type and quantity of traffic (number of lanes and intensity of traffic defined as <20, 20-49 or ≥50 trucks or buses per day on the residence facing the traffic street) were asked about each residence with windows

Table 1. Characteristics of the cases and controls.

	CASES		CONTROLS		p-value*
	n	%	n	%	
Gender					
Male	1067	87%	1105	87%	
Female	152	13%	166	13%	0.6585
Age; mean (sd)†	66	(10)	65	(10)	0.0023
Subjects per region					
Barcelona	229	19%	247	19%	
Sabadell/Bages	188	15%	190	15%	
Alicante	89	7%	84	7%	
Tenerife	219	18%	226	18%	
Asturias	495	41%	524	41%	0.9592
Race					
White	1214	99.6%	1270	99.9%	
Non-white	5	0.4%	1	0.1%	0.0917
Educational level					
Less than primary school	563	46%	592	47%	
Primary school	470	39%	491	39%	
High school / higher education	166	14%	164	13%	
Other	15	1%	15	1%	0.9658
Smoking					
Never smokers	166	14%	367	29%	
Occasional smokers	52	4%	97	8%	
Former smokers	470	39%	475	37%	
Current smokers	529	43%	326	26%	<0.0001

\*sd: Standard deviation; † p-value from the Chi-square test

facing a traffic street. The size of the city of residence was obtained from the National Institute of Statistics, Spain, for the year 2000. For each of these indices, we classified subjects according to air-pollution exposure information and the number of years spent at each residence during their lifetime as low exposure and high exposure (Table 2). Subjects that did not fit in either category were classified as “intermediate exposure”. For instance, a subject who lived all his/her life in residences without windows facing a heavy traffic street was classified as low exposure; by contrast, a subject who lived more than 30 years in residences with windows facing a traffic street was classified as high exposure.

Table 2. Description of air-pollution indicator variables and time spent in all life-time residences

	Proximity to industries	Windows facing traffic street	Number of lanes	Intensity of trucks and buses	Size of the city
<b>Low exposure</b>	No industries	No windows facing traffic street	No windows facing traffic street	No windows facing traffic street	>25 years living in a small village (<20,000 inhabitants)
<b>High exposure</b>	>25 years	>30 years	≥25 years with more than 2 lanes street (both sides)	≥25 years with high intensity traffic	>40 years living in a big city (>100.000 inhabitants)

Note: subjects that did not fit in either of the two extreme categories were considered as intermediate exposed. Type and quantity of traffic (number of lanes and intensity of traffic on residence facing the traffic street) were asked of subjects who had windows facing a traffic street.

Subjects reporting the presence of an industry within one kilometer of their residence were asked to report the type of industrial plant (i.e. textile, coal mine etc) and, if they knew, the main products (i.e. cars, electric equipment, etc). Subjects reported a broad spectrum of industry types and primary products (488 different entries). An industrial hygienist (SG) evaluated the possible emissions of PAHs and diesel particles from each of these industries, blinded as to case-control status. These evaluations were then reviewed by a second expert (MD) and exposure to PAHs and diesel particles was assigned to 737 subjects who reported having an industry in the vicinity of their home.

Results are reported for lifetime exposure; introducing a lag in the exposure windows did not change the observations, and results are not shown. We also analyzed the air pollution indices for the longest residence only; results were similar to those obtained when using lifetime residential history, and are not shown here. Residential history was available for a total of 137,217 person-years (84% of the total person-years of subjects in the study from birth until interview), with a mean duration of 19 years at each residence, ranging from 15 years in the area of Barcelona to 22 years in the Alicante area.



Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated using logistic regression using the statistical package Stata 8.2. Results were adjusted for age, gender, region, smoking (pack-years) and *a priori* high-risk occupations (metal workers, hairdressers and barbers, painters, chemical, leather, transport and rubber industries). Additional adjustment for consumption of fruits and vegetables and for exposure to disinfection by-products in water did not modify results and are not presented. Tests for linear trend were performed.

## RESULTS

Most subjects (87%) were males (Table 1). Smoking status differed between cases and controls and also between genders, with 13% of males being never smokers compared with 79% of females. The average time of residence in the same home was on average 18 years for cases and 19 years for controls. Thirty-four percent of cases and 33% of controls had ever lived in residences having industries in their proximity (table 3), and more than half of the subjects did not have windows facing a heavy traffic.

Living more than 40 years in a city with more than 100,000 population, compared with living more than 25 years in a small village, was associated with an increased risk of bladder cancer (OR=1.30, CI 1.04-1.63; never smokers 1.17, 0.71-1.94) (Table 3). Subjects with intermediate exposures had also an increased risk (OR 1.23, 1.00-1.53; never smokers 1.25, 0.75-2.07), with a significant increasing risk for all subjects (p-trend=0.027). Lower, non-significant excess risks were observed for residential proximity to an industry (OR for >25 years = 1.14, CI 0.90-1.44; never smokers 1.18, 0.70-2.00), and for number of lanes (OR= 1.11, 0.65-1.92; never smokers 1.24, 0.44-3.52). A small non-statistically significant excess risk for windows facing heavy traffic streets was seen only among never-smokers (1.30, 0.80-2.12). Combinations of exposure indices to take into account different sources of air pollution did not substantially modify most results (Table 3). Similar results were observed for the longest residence, with an OR of 1.07 (0.94-1.21) for having windows facing a heavy traffic street and 1.21 (0.95-1.56) for living in a big city.

Table 3. Adjusted Odds Ratios for the air pollution indicators, for all subjects and non-smokers

	ALL SUBJECTS†			NEVER-SMOKERS‡		
	N cases	N controls	OR (95% CI)	N cases	N controls	OR (95% CI)
Size of the city of residence						
Low exposure	305	384	1.00	57	141	1.00
Intermediate	477	483	1.23 (1.00-1.53)	45	100	1.25 (0.75-2.07)
High exposure	407	385	1.30 (1.04-1.63)	57	119	1.17 (0.71-1.94)
			$P_{trend}=0.026$			$P_{trend}=0.330$
Having windows facing traffic street at home						
Low exposure	625	652	1.00	66	166	1.00
Intermediate	287	309	1.05 (0.85-1.30)	45	107	1.00 (0.61-1.63)
High exposure	272	290	0.98 (0.79-1.21)	46	88	1.30 (0.80-2.12)
			$P_{trend}=0.900$			$P_{trend}=0.277$
Number of lanes at the street close to the place of residence§						
Low exposure	437	462	1.00	81	181	1.00
Intermediate	464	527	0.93 (0.76-1.13)	67	162	0.93 (0.61-1.42)
High exposure	31	33	1.11 (0.65-1.92)	7	14	1.24 (0.44-3.52)
			$P_{trend}=0.703$			$P_{trend}=0.710$
Intensity of trucks and buses at the street close to the place of residence§						
Low exposure	437	462	1.00	81	181	1.00
Intermediate	315	362	0.96 (0.77-1.21)	47	119	0.88 (0.55-1.42)
High exposure	178	195	0.91 (0.70-1.18)	27	56	1.13 (0.64-1.99)
			$P_{trend}=0.460$			$P_{trend}=0.746$
Having an industry close to the residence						
Low exposure	776	838	1.00	97	230	1.00
Intermediate	205	218	1.12 (0.90-1.44)	27	66	1.12 (0.64-1.96)
High exposure	203	195	1.14 (0.90-1.44)	33	65	1.18 (0.70-2.00)
			$P_{trend}=0.202$			$P_{trend}=0.532$
Living close to an industry and having windows facing a traffic street						
Low exposure	499	544	1.00	42	132	1.00
Intermediate	593	618	1.13 (0.94-1.35)	101	201	1.56 (0.99-2.46)
High exposure	92	89	1.14 (0.82-1.60)	14	28	1.58 (0.72-3.50)
			$P_{trend}=0.208$			$P_{trend}=0.072$

\* Number of subjects does not add up because of missing values

† Adjusted for age, gender, region, smoking -packyears and *a priori* high-risk occupations (additional adjustment for chlorination by-products and consumption of fruit and vegetables did not modify the results)‡ Adjusted for age, gender, region, *a priori* high-risk occupations, passive smoking at home and passive smoking at work (additional adjustment for chlorination by-products and consumption of fruit and vegetables did not modify the results)

§ Subjects having windows facing a traffic street at home

Among subjects living close to industries, experts assessed possible emissions of PAHs and diesel exhaust from the reported industrial plants. For example, repair shops and metallurgy industries were classified as having emissions of both pollutants; on the other hand, steel works, sulfur or coal industries were considered to have only PAH emissions. Only subjects that had a score from the industrial hygienist evaluation were included in the exposed group of subjects. The referent in the analysis was the group of subjects that reported never having industries in the proximity of their residences during their lives. A higher but not statistically significant risk was observed among subjects with residences within 1 km of an industry with either PAH or diesel emissions (OR=1.21, CI 0.94-1.55), and for exposure to both pollutants (OR=1.29, CI 0.85-1.98); p-value for trend > 0.05, (Table 4). Length of time lived in the residence did not modify these results substantially, nor did adjustment by occupational history or size of the city. This analysis was not done separately for never smokers because of small numbers.

Table 4. Risk of bladder cancer (odds ratios) for living close to industries emitting PAHs or diesel according to an industrial hygienist evaluation (restricted to those subjects who reported the type of industry and emissions were evaluated)

Residence	N cases	N controls	OR (95% CI)
No proximity to industries	769	831	1.00
Proximity to non-PAH emitting industries	126	144	0.95 (0.72-1.25)
Proximity to PAHs emitting industries	226	215	1.23 (0.98-1.55)
			$P_{trend}=0.111$
No proximity to industries	769	831	1.00
Proximity to non-diesel emitting industries	126	144	0.94 (0.72-1.24)
Proximity to diesel emitting industries	55	49	1.25 (0.82-1.90)
			$P_{trend}=0.570$
No proximity to industries	769	831	1.00
Proximity to industries non-PAH non-diesel emitting	126	144	0.95 (0.72-1.25)
Proximity to industries emitting PAHs or diesel	171	168	1.21 (0.94-1.55)
Proximity to industries emitting both PAHs and diesel	55	48	1.29 (0.85-1.98)
			$P_{trend}=0.102$

\* Adjusted for age, gender, smoking-packyears, region and *a priori* high-risk occupations (additional adjustment for chlorination by-products and consumption of fruit and vegetables did not modify the results)

In a stratified analysis by gender, ORs for all air pollution indices tended to be slightly higher in women than men, but differences were not statistically significant. For example, having spent most of one's life in a big city vs. a small town was associated with only a slightly higher risk in women (n=311, OR=1.34, CI 0.74- 2.42) than men (n=2129, OR= 1.30, CI 1.02-1.67). The OR for male subjects (n=2125) who lived more than 25 years close to an industrial plant compared with those who never lived close to industries was 1.09 (95%CI 0.85-1.40). In women (n=309) the corresponding OR was 1.51 (0.79-2.89). Differences between genders were not pronounced for size of the city of residence.

## DISCUSSION

We examined the association of bladder cancer risk with air pollution indicators for traffic and industry in a large case-control study. We found small to moderate positive associations for several indices of air-pollution. Our findings are supported by studies showing elevated risk of bladder cancer among workers with occupational exposure to PAHs and diesel engine exhaust (5). The strength of associations of bladder cancer risk with ambient air pollution exposures are likely to be considerably lower than those observed in the occupational environment, similar to what has been found for environmental lung cancer (2;12-14).

Similar to other studies examining long-term effects of air-pollution, the exposure indicators used in this analysis were based on both individual and grouped data (14-16). There was a high likelihood of misclassification in estimates of lifetime exposure particularly since exposure estimates were mainly based on self-reports. A statistically significant association of bladder cancer risk was found with size of the city, and risk increased with time lived in large cities. Lower excess risks were observed among subjects who lived close to an industry or lived on a street with more than two lanes for 25 years or more. City size is an ecologic variable that correlates well with air-pollution measurements, and it has been used as an indicator of air pollution (15;17).

Nonetheless, subjects living in different size cities may also differ in life style, and residual confounding may occur after adjusting for major bladder cancer risk factors.

Smoking is the main risk factor associated with bladder cancer, and might confound the relationship between air pollution and bladder cancer. The associations we observed tended to be stronger among never smokers. More than 50% of bladder cancer in men and about 30% in women have been attributed to smoking (18). A higher risk among non-smokers, even if not significant, indicates that the overall excess risk for all study subjects cannot be attributed to residual confounding by smoking, and supports the observed associations. Residual confounding by other risk factors for which we adjusted in the analysis such as diet, social class or other environmental contaminants, could also be present. These risk factors are only weakly associated with bladder cancer risk and it is unlikely that incomplete adjustment would have affected results for air-pollution in any considerable way.

Accurate exposure assessment is a key step in the study of air pollution-related disease. For long-term air pollution, individual measures are not available, and imputing fixed-site air monitoring measurements to an individual may lead to errors, due to the heterogeneity in the distribution of the traffic-related compounds in the air (19). Levels of traffic intensity were not available to validate the traffic-related exposure to air pollution. In a recent study of exposure to PAHs, self reported traffic density through a survey was comparable (Kruskal-Wallis one-way ANOVA,  $p=0.0001$ ) with GIS-measured traffic density values (20). With the exception of the city of Barcelona (1,505,000 inhabitants), very few measurements of airborne PAHs are available in Spain. During the period 1987-88, the mean level of the sum of 12 PAHs in the air in the city of Barcelona was  $50 \text{ ng/m}^3$ , with much higher levels in winter than in summer ( $85 \text{ vs. } 24 \text{ ng/m}^3$ ) (21); for the same period of time, the mean level of Total Suspended Particles (TSP) was  $175 \text{ }\mu\text{g/m}^3$ . In the beginning of the 1990s, TSP levels dropped to a mean level of  $56 \text{ }\mu\text{g/m}^3$  and PAHs levels to  $5.80 \text{ ng/m}^3$  (communication from the Highway and Urban Air Pollution Symposium, Barcelona, May 2002) mainly due to the shift from gasoline/diesel to natural gas as the power source of most industries, and to the more stringent regulation of vehicular exhaust. Data from the cities of Sabadell (185,000 inhabitants; Vallès region) and Manresa (64,000 inhabitants; Bages

region) were available only from 1995 to 1998, with a mean TSP level of 124 and 91  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  respectively (data from the Catalan Air Pollution Monitoring Network webpage:

[http://mediambient.gencat.net/cat/el\\_medi/atmosfera/immissions/inici.jsp?ComponentID=28451&SourcePageID=23429#1](http://mediambient.gencat.net/cat/el_medi/atmosfera/immissions/inici.jsp?ComponentID=28451&SourcePageID=23429#1), and the Environment Ministry of Government of Catalonia). Data on TSP variables from the main cities in the Asturias region were also available for the period 1993-98 with mean levels for Oviedo (201,000 inhabitants), the main city of the region, being 76  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (data from the Principado de Asturias government). Although no data are available, it can be expected that air-pollution levels decreased in all regions of Spain as they did in Barcelona. The limited amount of data does not allow constructing a retrospective ecological exposure model. Some indicators, such as living near a major road, are likely surrogates for exposure at least for some contaminants (22) (23) and have been associated with mortality (24) and in the EPIC study in Europe with lung cancer incidence (2).

In addition to traffic, industrial emissions also contribute to airborne PAHs. From the 498 types of industries or combinations of these industries reported, the most common were metallurgy, textile industry, foundry, and refinery, representing 25 % of the total. All primary metals industries and petroleum-related industries have relatively high airborne emissions of PAHs. The Toxic Release Inventory of the Environmental Protection Agency in the USA estimates that more than 60% of the total PAHs emissions during the year 2000 were from these industries. The textile industry ranked third, with 9% of total emissions (Toxics Release Inventory Program-US. Environmental Protection Agency). Therefore we evaluated the specific emissions of PAHs and diesel fumes from these industries that were located within one kilometer of places of residence of cases and controls. Diesel fumes contain both PAHs and nitro-PAHs (25), the latter clearly associated with mutagenic activity (26).

It is unlikely that the selection of hospital controls from the catchment area of the hospitals has biased our results. None of the hospitals included in the study is a referral hospital for cancer and both cases and controls were selected from the catchment area of the hospitals. In addition, the regions from where subjects originated were large enough to ensure heterogeneity of environmental exposures. Finally, cases

and controls were selected on the basis of current residence but information to air-pollution was derived from lifetime residential history. We consider that exposure misclassification was non-differential for cases and controls, and if any, we would expect the bias to be towards the null.

Our study is the first to examine risk of bladder cancer and exposure to air pollution. Small to moderate positive associations were found for several indices of air-pollution, with slightly stronger associations found among never smokers. However, most results were not statistically significant. An association of several air pollutants with bladder cancer is supported by findings from high exposure occupational settings, even though the increased risk for environmental exposures would not be expected to be high.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING**

We thank Nino Kuenzli for his comments on the paper. We thank Robert C. Saal from Westat, Rockville, MD, Leslie Carroll and Eric Boyd from IMS, Silver Spring, MD, and Paco Fernández, IMIM, Barcelona, for their support in study and data management; Dr. Maria Sala from IMIM, Barcelona, for her work in data collection; Silvia González (SG) for the evaluation of industrial emissions, Jan-Paul Zock, Hans Kromhout and Ferran Ballester for helping with exposure assessment and physicians, nurses, interviewers (Ana Alfaro, Cristina Villanueva, Cristina Pipó, Joan Montes, Iolanda Velez, Pablo Hernández, Ángeles Pérez, Carmen Benito, Adela Castillejo, Elisa Jover, Natalia Blanco, Avelino Menéndez, Cristina Arias, Begoña Argüelles) and all participants in the study for their efforts during field work. This research was primarily supported by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Division of Cancer Epidemiology and Genetics (NCI Contract No.NO2-CP-11015). This project was also funded by the Spanish Ministry of Health (FIS 2001-2002), the EPICUR-red (ISIII-GO3/174) and the European Union (Environment and genetic factors in bladder cancer: a multicentric case-control study in Europe. BIOMED. 1998-2001).

#### **COMPETING INTERESTS**

None

**Statement**

“The corresponding author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article to be published in Occupational and Environmental Medicine editions and any other BMJ PGL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence (<http://oem.bmjournals.com/ifora/licence.pdf>).”

**REFERENCES**

- (1) Pope CA, III, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE et al. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Res Crit Care Med* 1995; 151(3 Pt 1):669-674.
- (2) Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, Vigna-Taglianti F, Veglia F, Airoidi L et al. Air pollution and risk of lung cancer in a prospective study in Europe. *Int J Cancer* 2006; 119(1):169-174.
- (3) Boffetta P, Silverman DT. A meta-analysis of bladder cancer and diesel exhaust exposure. *Epidemiology* 2001; 12(1):125-130.
- (4) Kogevinas M, 't Mannetje A, Cordier S, Ranft U, Gonzalez CA, Vineis P et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control* 2003; 14(10):907-914.
- (5) Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997; 8(3):444-472.
- (6) Silverman DT, Hoover RN, Mason TJ, Swanson GM. Motor exhaust-related occupations and bladder cancer. *Cancer Res* 1986; 46(4 Pt 2):2113-2116.
- (7) International Agency for Research on Cancer. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1989; 46:321.



- (8) Tremblay C, Armstrong B, Theriault G, Brodeur J. Estimation of risk of developing bladder cancer among workers exposed to coal tar pitch volatiles in the primary aluminum industry. *Am J Ind Med* 1995; 27(3):335-348.
- (9) Bayona JM, Casellas M, Fernandez P, Solanas AM, Albaiges J. Sources and seasonal variability of mutagenic agents in the Barcelona City aerosol. *Chemosphere* 1994; 29(3):441-450.
- (10) Rogge WF, Hildemann LM, Mazurek MA, Cass GR. Sources of fine organic aerosol. 2. Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy-dust diesel trucks. *Environ Sci Technol* 1993; 27:636-651.
- (11) Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn I. *Histological typing of urinary bladder tumours*. Berlin: Springer-Verlag, 1999.
- (12) Vineis P, Forastiere F, Hoek G, Lipsett M. Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiologic evidence. *Int J Cancer* 2004; 111(5):647-652.
- (13) Richiardi L, Boffetta P, Simonato L, Forastiere F, Zambon P, Fortes C et al. Occupational risk factors for lung cancer in men and women: a population-based case-control study in Italy. *Cancer Causes Control* 2004; 15(3):285-294.
- (14) Pope CA, III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287(9):1132-1141.
- (15) Hoek G, Fischer P, Van Den BP, Goldbohm S, Brunekreef B. Estimation of long-term average exposure to outdoor air pollution for a cohort study on mortality. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2001; 11(6):459-469.
- (16) Heinrich J, Gehring U, Cyrys J, Brauer M, Hoek G, Fischer P et al. Exposure to traffic related air pollutants: self reported traffic intensity versus GIS modelled exposure. *Occup Environ Med* 2005; 62(8):517-523.
- (17) Moore M, Gould P, Keary BS. Global urbanization and impact on health. *Int J Hyg Environ Health* 2003; 206(4-5):269-278.

- 
- (18) Kogevinas M, Trichopoulos D. Urinary bladder cancer. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, editors. Textbook of cancer epidemiology. New York: Oxford University Press, 2002: 446-466.
- (19) Exposure assessment in studies on the chronic effects of long-term exposure to air pollution. 2003. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe.
- (20) Gunier RB, Reynolds P, Hurley SE, Yerabati S, Hertz A, Strickland P et al. Estimating exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a comparison of survey, biological monitoring, and geographic information system-based methods. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(7):1376-1381.
- (21) Aceves M, Grimalt J. Seasonally dependent size distributions of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols from densely populated areas. *Environ Sci Technol* 1993; 27(13):2896-2908.
- (22) Janssen NAH, VanMansom DFM, VanDerJagt K, Harssema H, Hoek G. Mass concentration and elemental composition of airborne particulate matter at street and background locations. *Atmos Environ* 1997; 31(8):1185-1193.
- (23) Roorda-Knape MC, Janssen NAH, de Hartog JJ, van VLiet PHN, Harssema H, Brunekreef B. Air pollution from traffic in city districts near major motorways. *Atmos Environ* 1998; 32(11):1921-1930.
- (24) Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, van den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002; 360(9341):1203-1209.
- (25) Stenberg U, Alsberg T, Westerholm R. Emission of carcinogenic components with automobile exhausts. *Environ Health Perspect* 1983; 47:53-63.
- (26) Rosenkranz HS. Mutagenic and carcinogenic nitroarenes in diesel emissions: risk identification. *Mutat Res* 1984; 140(1):1-6.

**Main messages**

- Several air-pollutants such as PAHs, have been shown in the occupational setting, to increase bladder cancer risk.
- Small to moderate positive associations were found for several indices of air-pollution and bladder cancer.
- Associations between air-pollution and bladder cancer risk were stronger among non-smokers.

**Policy implications**

- Air-pollution is being associated with an increasing number of health outcomes.
- Risk assessment for the evaluation of levels of exposure to air pollution should also consider bladder cancer as one of the potentially associated health outcomes.

Podeu consultar l'article també aquí:

Castaño-Vinyals G, Cantor KP, Malats N, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C, Carrato A, Rothman N, Vermeulen R, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M. [Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain](#). Occupational and Environmental Medicine 2007, Jul 18 [Epub ahead of print].

## ARTICLE 3

---

*Castaño-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M. Biomarkers of exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from environmental air pollution. Occupational and Environmental Medicine 2004; 61(4):e12.*

---

## RESUM

Els metabòlits del pirè i els aductes d'ADN han estat utilitzats com a biomarcadors d'exposició a nivells elevats d'hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs). Es va realitzar una revisió sistemàtica per avaluar si aquests marcadors són també vàlids per a nivells baixos d'exposició ambiental a PAHs. Trenta-cinc estudis van ser identificats amb més de 10 individus que van avaluar la contaminació atmosfèrica a PAHs en relació a metabòlits de PAHs, principalment hidroxipirè (1-OHP), aductes d'ADN o aductes en proteïnes. Els metabòlits de PAHs i, en menor mesura, els aductes d'ADN es van correlacionar bé a nivell de grup amb l'exposició a B(a)P, fins i tot a nivells baixos de contaminació atmosfèrica. L'ús d'aquests biomarcadors s'hauria d'implementar més àmpliament en combinació amb tècniques més tradicionals per l'avaluació de l'exposició a PAHs provinents de la contaminació atmosfèrica en la població general.

---

**Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons  
from environmental air pollution**

---

**Gemma Castaño-Vinyals**

*Respiratory and Environmental Research Unit; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain.*

**Angelo D'Errico**

*Servizio Sovrazonale di Epidemiologia; Grugliasco-Regione Piemonte, Torino, Italy.*

**Nuria Malats; Manolis Kogevinas**

*Respiratory and Environmental Research Unit; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain.*

**ABSTRACT**

Metabolites of pyrene and DNA adducts have been used as biomarkers of high-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). A systematic review was performed to evaluate whether these biomarkers are also valid markers of low level environmental exposure to PAHs. Thirty five studies were identified with more than 10 subjects that evaluated environmental air pollution to PAHs in relation to metabolites of PAHs, mainly hydroxypyrene (1-OHP), PAH-DNA adducts or protein adducts. PAH metabolites and, to a less extent, PAH-DNA adducts correlated well at group level with exposure to B(a)P even at low levels of air pollution. The use of these biomarkers should be more widely implemented in combination with more traditional techniques for the assessment of general population exposure to PAHs from ambient air pollution.

**Abbreviations**

B(a)P: benzo(a)pyrene

PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon

## INTRODUCTION

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are a group of organic chemicals characterized by chemical stability, low volatility and low solubility in water. PAHs are formed during the incomplete combustion of organic substances, are widespread in the environment, and typically occur in mixtures. Health damage associated with PAHs exposure has been evaluated repeatedly by different health and environmental protection agencies such as the International Agency for Research on Cancer (IARC), the Environmental Protection Agency (EPA), the National Toxicology Program (NTP) and the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Seven compounds, including benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene and indeno(1,2,3-c,d)pyrene, are considered by several agencies as human carcinogens.

The main sources of human exposure to PAHs are occupation, passive and active smoking, food and water, and air pollution (1). The total intake of carcinogenic PAHs in the general population has been estimated to be 3 µg/day (2). Levels of occupational exposure of benzo(a)pyrene (B(a)P) that is one of the main PAH compounds, vary widely in different industrial activities and job titles, ranging from 0.1 to 48000 ng/m<sup>3</sup> (3), (4), (5). In smokers, B(a)P levels range from 0.5 to 7.8 µg/100 cigarettes when exposure is from mainstream smoke and from 2.5 to 19.9 µg/100 cigarettes when it comes from side-stream smoke. Levels from passive smoking are lower, ranging from 0.0028 to 0.76 µg/ m<sup>3</sup> of B(a)P (6). Beside occupational exposure, dietary intake seems the most important source of PAHs in non-smokers; in the USA, dietary intake of total PAHs has been estimated to be almost 2 µg/kg food (6), with high levels of B(a)P found especially in charcoaled meat (8 µg/kg), while in a variety of other food products B(a)P levels from 0.09 to 30 µg/kg (7), (6) have been reported. Levels in water may range from 0 to 13 µg/l B(a)P. There is a high variation in atmospheric PAHs levels across geographical areas with B(a)P concentrations ranging from 0.01 to 100 ng/m<sup>3</sup> B(a)P (8). Airborne PAHs are usually analysed by gas chromatography/mass spectrometry (9),(10) or high performance liquid chromatography (11),(12),(13),(14) mostly from particles collected in a filter after extraction with organic solvents.

Pollution of air by PAHs is mainly due to the incomplete combustion of wood or fuel used for residential heating and industrial or motor vehicle exhaust (11). The level of exposure to PAHs through this source is low compared to other sources such as diet, occupation or tobacco smoke. The half-life of airborne PAHs is of the order of days but can be longer when they bound to small particles (2). In the cities where residential heating is the main source of PAHs, air pollutant PAH levels during winter are frequently higher than in summer (15),(16),(17). Nevertheless, some studies that found very low levels of B(a)P (range 0.03-3.3 ng/m<sup>3</sup>) did not show a seasonal variation (11). Inhaled PAHs are absorbed mainly through the bronchial epithelium. Absorption can be influenced by the size of the particles, with a slower clearance of those adsorbed on particles compared to PAHs in pure crystals (18), (19). After absorption, PAHs are distributed to tissues where they are biotransformed by phase I metabolic enzymes to chemically reactive intermediates, that may bind covalently to DNA (DNA adducts), give rise to mutation and, eventually, tumour initiation. Furthermore, PAH metabolites are mostly conjugated with glucuronic acid by phase II enzymes and excreted as hydroxylated metabolites or in a small proportion as sulphate or even unconjugated. PAHs are excreted mainly through the faeces; only about 10% are excreted in the urine.

The difficulty of finding an index substance arises from the fact that the composition of PAH mixtures depends on the combustion source. The most common compound used as a reference substance for carcinogenic PAHs is benzo(a)pyrene (B(a)P). B(a)P was the first PAH recognized to display carcinogenic activity and, more importantly, it has a high carcinogenic potency and is present in all environmental media.

The most commonly used biomarkers of PAHs exposure are metabolites of PAHs, particularly 1-hydroxypyrene, and PAH-DNA or protein adducts. 1-Hydroxypyrene (1-OHP) is the principal product of pyrene metabolism, representing 90% of its metabolites (20). Following inhalation, the half-life of 1-OHP is on average about 18-20 hours (21), (22), (23). Pyrene is the only known precursor of 1-OHP (24); it forms a consistent proportion of higher molecular weight PAHs in the environment (25). The two main analytical methods employed to measure 1-OHP are high performance liquid chromatography combined with fluorescence detection (HPLC/FD), and gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS). For HPLC/FD, the detection limit

is 0.05 µg/l, with a recovery rate of 85%(26), and for GC/MS is around 0.1 µg/l with a higher recovery rate that reaches more than 93%(27). PAH adducts have been mainly employed as a measure of PAHs linked to DNA in target tissues (biological effective dose), although protein adducts have also occasionally been determined. The half-life of DNA adducts in lymphocytes is in the order of months, while for protein adducts it depends on the type of protein where the chemical is bound. In the case of albumin adducts, the half-life is around 20 days, while for haemoglobin adducts it is around 120 days. ELISA technique is used to measure specific DNA adducts, and <sup>32</sup>P-Postlabeling is used for the determination of bulky DNA adducts, also called aromatic adducts. Protein adducts are measured mostly in blood proteins using CG/MS, HPLC or ELISA.

**Policy implications**

The use of biomarkers of exposure to environmental levels of PAHs should be more widely implemented in combination with more traditional techniques for the assessment of general population exposure to PAHs from ambient air pollution.

Studies examining PAH exposure through smoking or in the occupational environment have shown that at high levels 1-OHP and DNA-adducts correlate well with B(a)P concentrations (28), whereas there exists less evidence on the correlation of PAH or B(a)P concentrations (5) with protein adducts. In this review we evaluate whether these biomarkers are valid markers of low level environmental exposure to PAHs.

**Main messages**

- Existing biomarkers for environmental exposure to PAHs correlate well at group level, with exposure to B(a)P even at low levels of air pollution.
- This association is stronger for PAH metabolites, particularly hydroxypyrene, but is also observed for PAH-DNA adducts.
- The use of these biomarkers when assessing environmental exposure at the individual level is limited.



## METHODS

### Selection of studies

We reviewed all the studies, which measured 1-OHP or adducts as biomarkers of exposure to PAHs in populations not occupationally exposed to these agents. We did not include studies on occupation, active and passive smoking, or diet since there already exist several recent reviews (28),(5),(29) and also because the level of exposure is too high to be comparable with the levels of PAHs in air. A search in the electronic database PubMed for all papers published from 1980 to 2002 on PAHs biomarkers was conducted. The keywords used were "(benzopyrene OR pah OR pahs OR pyrene) AND (biological monitoring OR biomonitoring OR biological markers OR biomarker OR biomarkers)". In addition, we checked our personal archives and examined the references of the papers identified.

In the first search, we found 723 articles that included both animal and human studies. We reviewed the abstracts and primarily selected 122 papers, after excluding animal studies, reviews and human studies with less than 10 subjects. We further excluded studies on occupationally exposed subjects and two studies on environmental exposure to PAHs, because DNA adduct levels were presented in units non-comparable to those of other studies (17), (30). Furthermore, five studies on 1-OHP were not included: two measured B(a)P metabolites instead of 1-OHP (31), (32), two reported 1-OHP levels in units not comparable to the rest of studies (33), (34), and the fifth study focused on intra- and inter-individual variability of 1-OHP (35). Finally, we included 36 studies of DNA and/or protein adducts or metabolites of PAHs that referred to exposure to PAHs through environmental air pollution (36), (16), (37), (38), (39), (40), (41), (3), (42), (43), (44), (45), (13), (46), (47), (48), (15), (12), (8), (49), (11), (9), (50), (17), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (57), (58), (7), (27), (59), (60), (61). In the selected studies, biomarker levels were presented for non-smokers or were adjusted for smoking, except for two studies that did not indicate if results were adjusted (12), (38) and another study (49) that did not adjust for smoking habits. Among the 19 studies analysing 1-OHP, 12 included non-smoking individuals. Eight studies on DNA adducts recruited only non-smokers, and five also have determinations on protein adducts.

## Statistical analysis

We estimated between-study differences and correlated mean biomarker levels with mean levels of B(a)P or the sum of eight carcinogenic PAHs in air (including benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, chrysene, benzo(a)pyrene, dibenzo(ah)anthracene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(ghi)perylene). The Pearson coefficient was estimated after log transformation of the mean values of benzo(a)pyrene in air and biomarker levels. Within study differences were also evaluated by comparing the mean biomarker levels in each study between exposed and unexposed (or less exposed) subjects. We did not perform a formal meta-analysis because studies were heterogeneous and did not allow a joint statistical evaluation. Heterogeneity between studies was tested through the Kruskal-Wallis equality of populations rank test that evaluates the hypothesis that several samples originate from similar populations. The p-values of the *t* test were  $p=0.028$  for 1-OHP and  $p=0.007$  for DNA adducts, indicating that the levels of biomarkers in the populations evaluated were different. The application of statistical techniques to adjust for inter-laboratory variation in the adducts analysis, such as the calculation of the “frequency ratio” that models the within study differences in adducts (29), (62), was not feasible due to the small number of studies and the heterogeneity in design between studies.

## RESULTS

### 1-Hydroxypyrene

We identified 19 studies evaluating 1-OHP in relation to air pollution. Fourteen had environmental measurements of the B(a)P in air and urinary 1-OHP (Table 1). Of the remaining five studies, two had no environmental data of any PAH (39), (60), one measured the sum of 10 PAHs as a measure of exposure (27), another presented the sum of eight carcinogenic PAHs (61) and one measured only pyrene in air (53). 1-OHP levels were not corrected for creatinine in two studies (39), (53) and these were not further considered. Of the 14 studies with air B(a)P and 1-OHP levels (expressed as  $\mu\text{mol}/\text{mol}$  creatinine), five presented biomarker levels of 1-OHP as geometric mean, two as the median and the remaining eight studies presented mean levels. Geometric

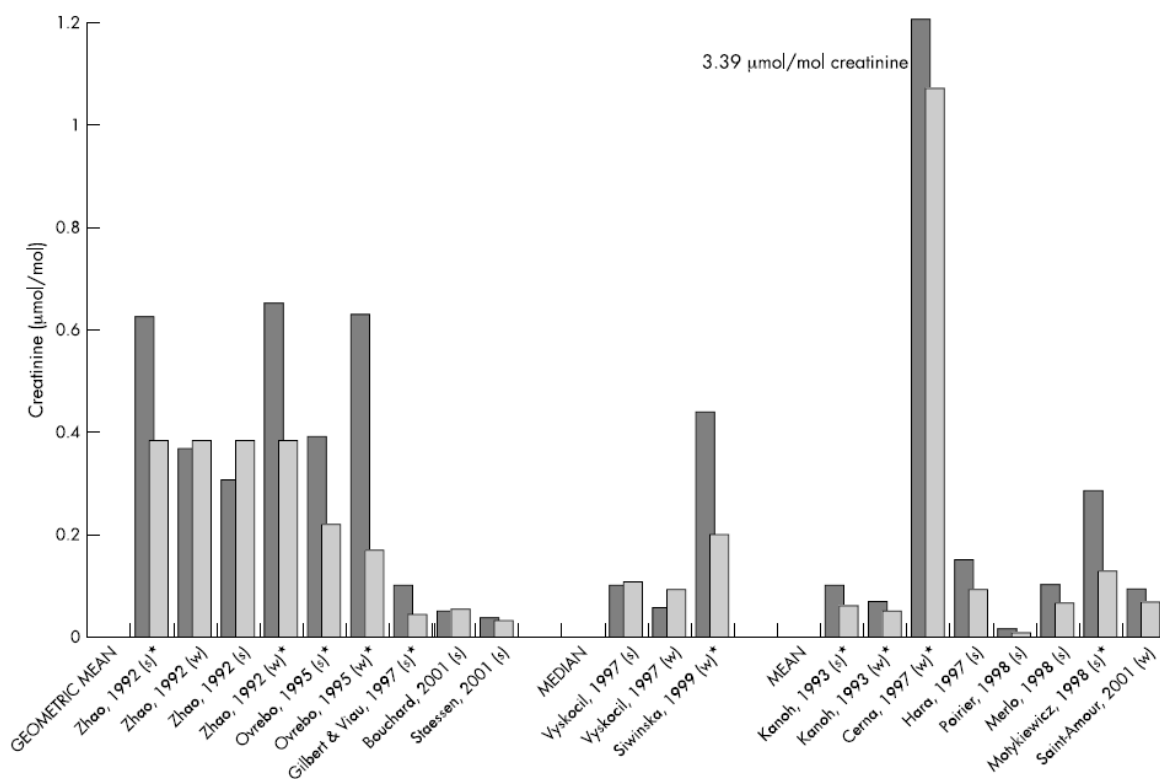
means were converted to arithmetic means when both the geometric mean and geometric standard deviation were available. We used the following formula (63) that is based on maximum likelihood estimation, under the assumption of a log-normal distribution of environmental BaP (64) and of 1-OHP concentrations (65):  $AM=GM*\exp((0.5*(\ln(GSD))^2*((N-1)/N))$ , where AM=arithmetic mean, GM=geometric mean, GSD=geometric standard deviation, N=number of subjects. Personal monitoring of B(a)P was done in five studies. In five other studies information on methods of determination of B(a)P was lacking (46), (47), (44), (27), (58). Levels of B(a)P exposure in the selected populations were in the range of 0.10-64.5 ng/m<sup>3</sup> and the levels of 1-OHP ranged from 0.01 to 3.39 μmol/mol creatinine.

Figure 1 shows within study differences in mean, median or geometric mean 1-OHP levels of subjects exposed and unexposed to environmental PAHs. The figure includes all studies except those by Chuang and colleagues (51) and Gundel and colleagues (44) because in these two studies the reference groups were smokers. In 15 out of 21 pairs of data exposed subjects had higher levels of 1-OHP than non-exposed subjects, and in 10 of the 21 comparisons the difference were statistically significant. However, none of the studies found a statistical significant correlation between environmental exposure to PAHs or B(a)P and urinary concentration of 1-OHP at the individual level.

**Table 1** Studies with B(a)P measurements in air and 1-OHP

Author, year	Country	Type of PAHs sampled	PAH monitoring	PAH analysis technique	Smoking status	1-OHP analysis	Season of sampling
Zhao, 1992	China	B(a)P	Personal	HPLC/FD	NS	HPLC/FD	Winter + summer
Kanoh, 1993	Japan	B(a)P	Stationary	n.a.	NS	HPLC/FD	Winter + summer
Hemminki, 1994	Sweden	—	—	—	NS	HPLC/FD	Winter
Ovrebø, 1995	Poland	B(a)P	Personal	GC/MS	All	HPLC/FD	Winter + summer
Gundel, 1996	Germany	B(a)P	Stationary	n.a.	NS	HPLC/FD	Winter + summer
Cerna, 1997	Czech Republic	B(a)P	Stationary	n.a.	NS	HPLC/FD	Winter
Gilbert and Viau, 1997	Canada	B(a)P	Stationary	n.a.	NS	HPLC/FD	Summer
Hara, 1997	Japan	B(a)P	Personal	HPLC/FD	NS	HPLC/FD	Summer
Vyskocil, 1997	Czech Rep	B(a)P	Stationary	HPLC/FD	NS	HPLC/FD	Winter + summer
Poirier, 1998	Germany, Kuwait	B(a)P	Stationary	GC/MS	All	HPLC/SFS	Summer
Merlo, 1998	Italy	B(a)P	Personal	HPLC/FD	NS	HPLC/FD	Summer
Motykiewicz, 1998	Poland	B(a)P	Stationary	GC	NS	HPLC/FD	Summer
Chuang, 1999	USA	B(a)P	Stationary	GC/MS	NS	GC/MS	Winter + summer
Pastorelli, 1999	Italy	Pyrene	Personal	HPLC/FD	All	HPLC/FD	Winter + summer
Siwinska, 1999	Poland	B(a)P	Stationary	HPLC/FD	NS	HPLC/FD	Winter
Saint-Amour, 2000	Canada	B(a)P	Stationary	GC/MS	NS	GC/MS	Winter
Bouchard, 2001	Canada	10 PAHs	Stationary	GC/MS	NS	GC/MS	Summer
Stoessen, 2001	Belgium	—	—	—	All	n.a.	Summer
Ruchiwarat, 2002	Thailand	Carcinogenic PAHs*	Personal	HPLC/FD	NS	HPLC/FD	Winter

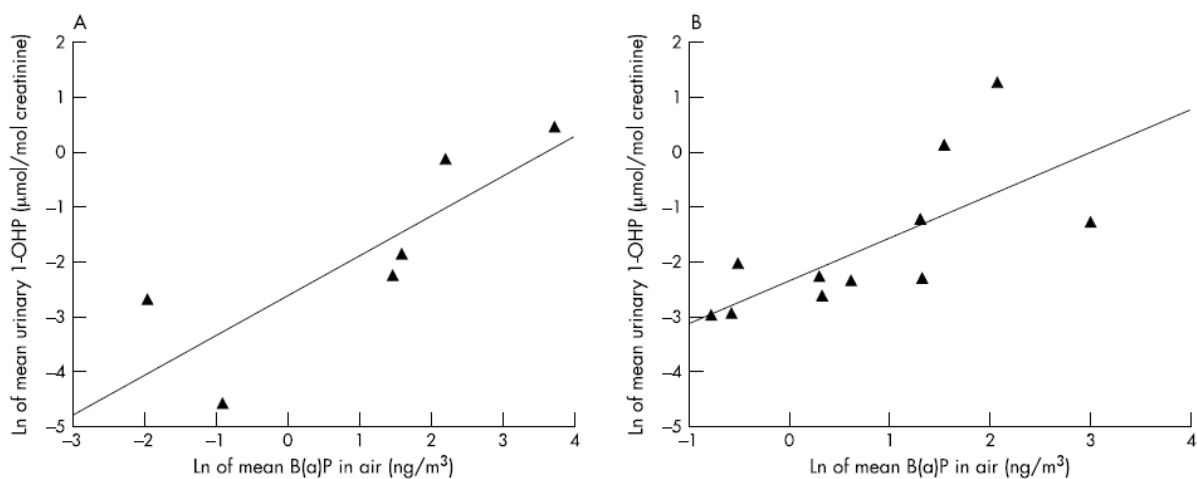
\*Carcinogenic PAHs: include benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, chrysene, benzo(a)pyrene, dibenzo(ah)anthracene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(ghi)perylene; B(a)P: benzo(a)pyrene.  
HPLC, high performance liquid chromatography; FD, fluorescence detection; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry; SFS, synchronous fluorescence spectrometry.  
NS, non-smokers; All, smokers and non-smokers.  
n.a., information not available.



**Figure 1** Comparison of levels of 1-OHP between exposed (dark bars) and unexposed (light bars) subjects environmentally exposed to PAHs.  
\* Statistically significant differences between exposed and unexposed subjects in each pair of data. w, winter; s, summer.

When evaluating between study differences, a statistically significant correlation was found between the log-transformed mean values of B(a)P and log-transformed mean values of 1-OHP (Pearson correlation coefficient,  $r=0.76$ ;  $p<0.001$ ), on the basis of 17 pairs of data of B(a)P and 1-OHP. The Pearson correlation coefficient was higher when evaluating mean values of B(a)P and median values of 1-OHP ( $r=0.83$ ,  $p=0.019$ , 7 pairs of data).

A higher correlation was found when the analysis was restricted to the four studies with personal sampling of B(a)P and presenting mean values for 1-OHP ( $r=0.83$ ;  $p=0.040$ ), as compared to studies doing stationary monitoring ( $r=0.70$ ,  $p=0.017$ ) (fig 2). In this correlation we considered independently every pair of data of B(a)P and 1-OHP, and some studies contributed therefore with more than one estimate.



**Figure 2** Correlation between environmental B(a)P levels and levels of 1-OHP in urine. (A) Pearson coefficient of natural log transformed values ( $p$  value). Personal monitoring and mean 1-OHP.  $r=0.831$  ( $p=0.04$ ). (B) Stationary monitoring and mean 1-OHP.  $r=0.70$  ( $p=0.017$ ).

## DNA adducts

From the 17 articles on DNA adducts included, seven studies measured B(a)P in air (16), (43), (13), (11), (9), (52), (56), (59), five studies reported measurements of other pollutants, either particulate matter or sums of different PAHs (41), (45), (12), (49), (61) and one study reported both B(a)P and sums of PAHs (13). The remaining four studies (38), (39), (42), (57) determined adducts but the exposure was defined using proxy

variables, usually whether subjects lived in an urban or rural environment (table 2). Sampling of PAHs was done through personal monitoring in six studies, with only one study sampling B(a)P (11). The method used to determine adduct levels was mostly <sup>32</sup>P-Postlabeling, applying either nuclease P1 or butanol enrichment procedures. Most studies were performed during winter, with some studies having measurements both in winter and summer. One study (52) found very high adduct levels compared to other studies in both exposed and unexposed subjects (table 2), and was not considered further.

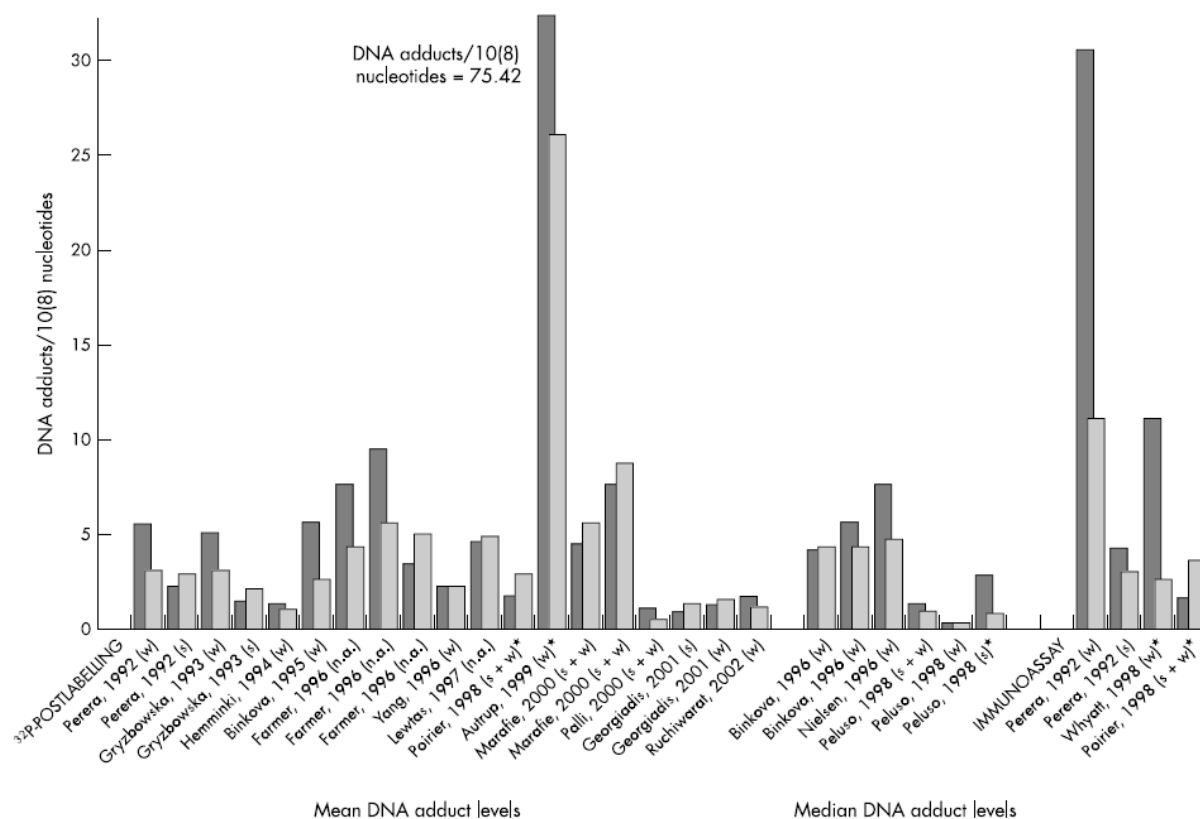
**Table 2** Studies of PAH environmentally exposed subjects with DNA adduct measurements

Author, year	Country	Type of air PAHs sampled	PAH monitoring	PAH analysis technique	Smoking status	DNA adduct analysis	Season of sampling
Perera, 1992	Poland	B(a)P	Stationary	GC/MS	All	<sup>32</sup> P-postlabelling; ELISA	Winter + summer
Grzybowska, 1993	Poland	n.a.	—	—	All	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1)	Winter + summer
Hemminki, 1994	Sweden	n.a.	—	—	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1)	Winter
Binkova, 1995	Czech Republic	Carcinogenic PAHs	Personal	HPLC	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (Nuclease P1 & Butanol extraction)	Winter
Farmer, 1996	Europe	Particulate matter	Stationary	n.a.	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling with HPLC	n.a.
Binkova, 1996	Czech Republic	Carcinogenic PAHs*; B(a)P	Personal	HPLC	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (butanol extraction)	Winter
Nielsen, 1996	Denmark	B(a)P	Stationary	n.a.	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1 and butanol extraction)	Winter
Yang, 1996	Italy	n.a.	—	—	n.a.	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1)	Winter
Lewtas, 1997	Czech Republic	Carcinogenic PAHs*	Personal	HPLC	All	<sup>32</sup> P-postlabelling (butanol extraction)	n.a.
Whyatt, 1998	Poland	PM10	Stationary	n.a.	All	ELISA	Winter
Poirier, 1998	Germany, Kuwait	B(a)P	Stationary	GC	n.a.	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1); Delfia	Winter + summer
Peluso, 1998	Italy	B(a)P	Personal	HPLC	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1)	Winter + summer
Astrup, 1999	Denmark	B(a)P	Stationary	n.a.	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (butanol extraction)	Winter
Marafie, 2000	Kuwait, UK	B(a)P	Stationary	n.a.	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1 and butanol extraction)	Winter + summer
Palli, 2000	Italy	n.a.	—	—	All	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1)	Winter + summer
Georgiadis, 2001	Greece	Carcinogenic PAHs*	Personal	n.a.	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (nuclease P1)	Winter + summer
Ruchiwarat, 2002	Thailand	Carcinogenic PAHs*	Personal	HPLC	NS	<sup>32</sup> P-postlabelling (butanol extraction)	Winter

\*Carcinogenic PAHs: include benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, chrysene, benzo(a)pyrene, dibenzo(ah)anthracene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(ghi)perylene.  
 B(a)P, benzo(a)pyrene; HPLC, high performance liquid chromatography; GC/MS, gas chromatography/mass spectrometry.  
 NS, non-smokers; All, smokers and non-smokers.  
 n.a., information not available.

In the 25 pairs of exposed-unexposed subjects measured in which adducts have been measured by <sup>32</sup>P-Postlabeling, 15 had higher DNA adduct levels in exposed compared to unexposed, whereas in 10 of the pairs unexposed subjects had higher levels (fig 3). In the three studies determining adducts using immunoassay, the exposed had higher levels than the unexposed in three out of four pairs of data (fig 3). The mean DNA adduct level measured by immunoassay was 14.33 adducts/10<sup>8</sup> nucleotides, and by

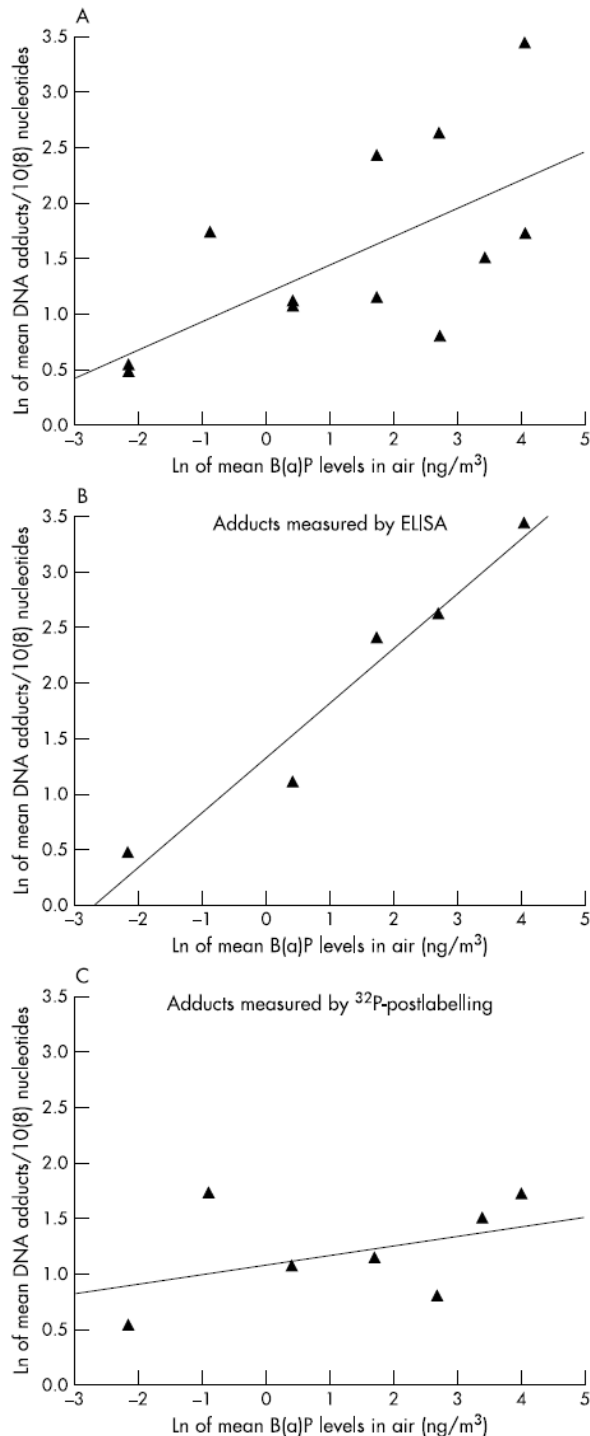
$^{32}\text{P}$ -Postlabeling 4.44 adducts/ $10^8$  nucleotides. The mean airborne B(a)P levels were also higher in those studies using immunoassay (20.94 ng/ $\text{m}^3$  B(a)P) as compared to levels in studies using  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling (8.67 ng/ $\text{m}^3$  B(a)P).



**Figure 3** Comparison of the levels of DNA adducts, analysed by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling and immunoassay in exposed (dark bars) and unexposed (light bars) subjects to environmental PAHs. \* Statistically significant differences between exposed and unexposed subjects in each pair of data. w, winter; s, summer; n.a., information not available.

After log transformation of data B(a)P levels in air and DNA adduct levels, the correlation between studies using stationary measurement of mean B(a)P in air and reporting mean DNA adducts was significant with a Pearson correlation coefficient of 0.60 (p-value=0.038) on the basis of 12 pairs of log transformed BaP and adducts data from 3 studies (fig 4A). This correlation includes data points that are not independent since in some studies the same subjects were evaluated using both Elisa and  $^{32}\text{P}$ -postlabelling. The correlation coefficient was higher for analysis using Elisa (Pearson correlation coefficient  $r=0.99$ ,  $p=0.019$ , 3 pairs of data) compared to  $^{32}\text{P}$ -postlabelling ( $r=0.46$ ,  $p=0.209$ , 9 pairs of data) (figs 4B and 4C). One additional study (43) reported median adduct levels and is not included in the graph or the correlations. Fewer

studies reported results on personal B(a)P monitoring and DNA adducts, using median adduct levels ( $r=0.53$ ,  $p=0.220$ , 7 pairs of data).



**Figure 4** Correlation between stationary measured mean B(a)P levels in air and mean DNA adducts. (A) Scatterplot of natural log transformed values of mean DNA adduct levels and stationary monitoring of B(a)P (overall). Pearson coefficient:  $r=0.60$  ( $p=0.038$ ). (B) Adducts measured by ELISA. Pearson coefficient:  $r=0.99$  ( $p=0.019$ ). (C) Adducts measured by <sup>32</sup>P-postlabelling. Pearson coefficient:  $r=0.46$  ( $p=0.209$ ).

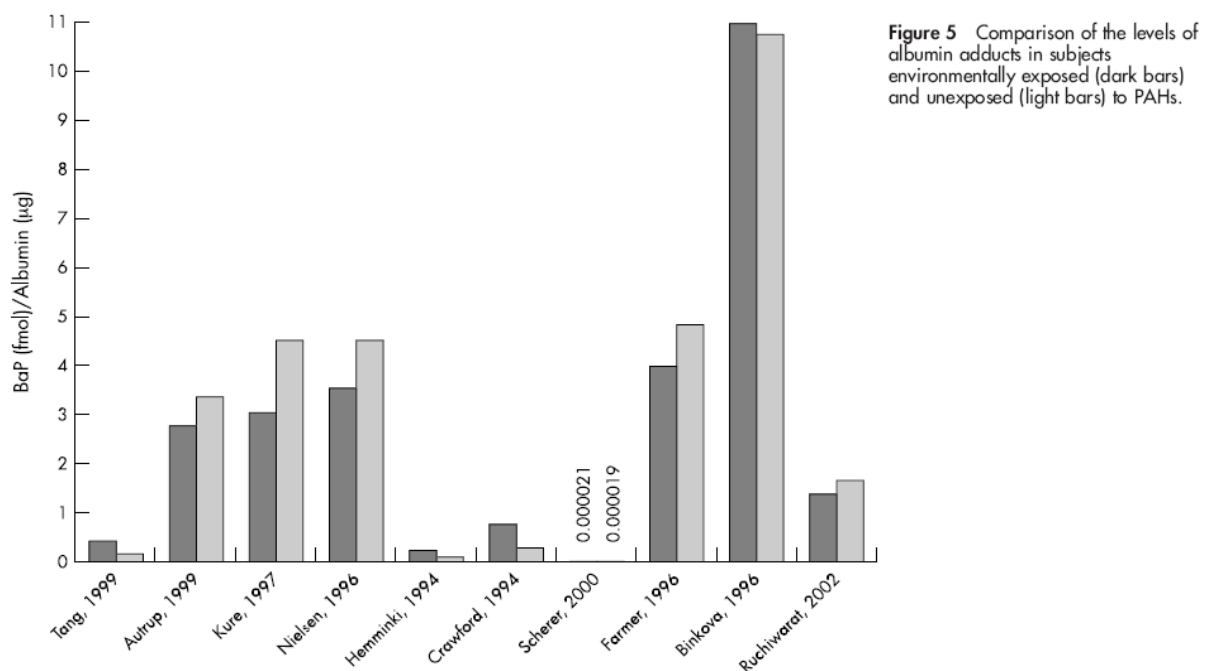
Four studies (13), (12), (59), (61) and a pilot study (41) measured the eight carcinogenic PAHs in air and determined adducts through <sup>32</sup>P-Postlabelling. One of these studies (41) reported median adduct levels rather than means, and was not considered further. Mean PAHs levels by personal monitoring were 14.9 ng/m<sup>3</sup> (range 1.62-72.9 ng/m<sup>3</sup>); mean DNA adducts was 2.54 adducts/10<sup>8</sup> nucleotides (range 0.92-5.59 adducts/10<sup>8</sup> nucleotides). The Spearman correlation coefficient between carcinogenic PAHs and DNA adducts was 0.617 ( $p=0.077$ ).

### Protein adducts

Nine studies determined albumin adducts using different techniques (55), (15), (40), (52), (43), (39), (45), (13), (61), one assessed BPDE-haemoglobin adducts (53), and another analysed both biomarkers (7). Albumin adduct levels in



exposed were higher than in unexposed subjects in five of these studies (fig 5), while in the remaining studies this relation was inverse. The mean albumin adduct levels in exposed was 2.75 fmol B(a)P/ $\mu$ g while in the unexposed subjects it was 3.04 fmol B(a)P/ $\mu$ g. Airborne B(a)P was only measured in 2 studies (52), (15), while another study measured particulate matter (45), and another measured the sum of eight carcinogenic PAHs (61).



**Figure 5** Comparison of the levels of albumin adducts in subjects environmentally exposed (dark bars) and unexposed (light bars) to PAHs.

## DISCUSSION

Studies on air pollution and health (66) have focused on short-term effects and have applied predominantly measures of exposure to ambient air pollutants. The use of biomarkers has focused on highly exposed populations, such as populations living in heavily exposed environments (67;67) or occupational groups (68),(69). Occupational studies and studies on active and passive smoking have reported positive correlations between B(a)P and some biomarkers, such as 1-OHP and PAH-DNA adducts (28), but in exposure situations where B(a)P concentrations were 10 to 100-fold higher than those normally found in ambient air concentrations. The use of biomarkers for evaluating low-level environmental exposures has been limited and their use has not

been generally accepted for the study of such exposures (70). In this review we showed that both PAH metabolites (1-OHP) and PAH-DNA adducts can be usefully applied to assess environmental exposure to PAHs at a group level. The correlation between environmental levels and 1-OHP was high in particular when personal monitoring of B(a)P was done, indicating that this biomarker can distinguish between fairly small exposure gradients. For DNA adducts the correlation, although statistically significant, was not as high and results were based on few studies. There was considerable heterogeneity between studies concerning methods used to measure exposure; for example, type of compounds measured and use of stationary or personal sampling, the methods used for biomarker determination, and the availability of information on confounders. These differences have probably resulted in an underestimation of the correlation between atmospheric PAHs and DNA adducts.

All the analyses presented are based on the correlation of mean levels of the environmental exposure and the biomarker levels. Individual levels would only be available if the raw data from each study were recovered and analysed. The overall variance in the populations studied is, therefore, underestimated in our analysis and this should affect the tests for statistical significance. It is, however, unlikely that comparison of mean values of both the exposure and the outcome has affected the main results since the slope of the correlation should not depend on the individual values within each study. What is more likely is that the slope we presented is an underestimate due to errors in the measurement of variables. The application of statistical techniques to adjust for inter-laboratory variation in the adducts analysis, such as the calculation of the "frequency ratio" that models the within study differences in adducts (29), (62), was not feasible due to the small number of studies and the heterogeneity in design between studies.

PAHs in the air are present at concentrations from tens of ng/m<sup>3</sup> in non-polluted or low-polluted areas to hundreds of ng/m<sup>3</sup> in polluted areas. Most studies have used B(a)P as a reference substance for carcinogenic PAHs because this compound has a carcinogenic potency 10-100 times greater than many other PAHs. Nonetheless, the presence in the environment of other PAHs, some of which carcinogenic, does not allow an accurate estimation of the risk linked to a PAH mixture on the basis of B(a)P

concentration alone. The major contributors to air PAHs in the urban and suburban atmosphere are mobile sources from diesel and gasoline engines. Emissions from these sources contain mainly benzo(g,h,i)perylene, pyrene, fluoranthene and phenanthrene (71), (72), so that measuring only B(a)P as an index substance may result in exposure underestimation.

High correlation coefficients were found between personal B(a)P measurements in air and 1-OHP levels, while the correlation was lower for PAH-DNA adducts. These results were less clear when comparing levels among exposed and unexposed subjects in a dichotomous way and in a few studies higher levels of 1-OHP and PAH-DNA adducts were found among unexposed subjects. This is probably due to the smaller differences in level of exposure to PAHs within studies, as compared to differences between studies. The correlation between studies indicates that differences as low as 5 ng/m<sup>3</sup> of B(a)P measured through personal monitoring can be identified using these biomarkers. In several studies differences between exposed and non-exposed were smaller than 5 ng/m<sup>3</sup> and in one study those defined as unexposed had actually higher levels of B(a)P than those defined as exposed. The less clear pattern identified when comparing within study differences may also be due to the lack of adequate control of confounders in many studies. Smoking status of subjects was not specified in some studies, while dietary intake was not considered by the great majority of the authors, although diet has been shown to be the major contributor to the total intake of PAHs (2) among non-smokers. Differences in the season of blood drawing may have been another factor affecting results. Air pollution originates in many cities mainly from residential heating and vehicle exhausts, and in general B(a)P levels in winter are higher than those measured during summer (16). This should be reflected in the adduct levels and could underestimate the correlation between PAHs exposure and the level of biomarker in those cases where the levels of atmospheric pollutants were only an annual mean (47), (44), (73), (16). These results point out the extreme importance of evaluating adequately both the biomarker and all the various potential environmental exposures to PAHs, since levels of these biomarkers reflect the exposure from many different sources (74), (43), (11), (55). Dickey and colleagues (75) estimated that 2.7 measures of PAH-DNA adducts should be determined to obtain the individual correct level in order to minimize intra-individual variability. Similarly, several measurements

of 1-OHP are required for a reliable assessment of environmental exposure to PAHs (35).

The analytical techniques used to measure adducts is another factor affecting results. Standardization of  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling has been achieved by means of an inter-laboratory trial in 1999 (76). This technique requires precision and several variations of the assay can be performed, which have been shown to produce very different results. These assay variations can explain some of the differences in DNA adduct levels measured by  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling. Higher adduct levels resulted from ELISA compared with  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling, although it is not clear if this was due to higher exposure to PAHs levels in studies using ELISA, or to higher sensitivity of the method. However, absolute comparisons between the two assays should only be made after calibration in a laboratory.

Protein adducts should, in principle, reflect the formation of DNA adducts (52). Results on protein adducts are however not consistent, although the number of studies analysed was quite small, compared to that of studies measuring DNA adducts. In addition, the techniques to measure protein adducts are still highly variable between laboratories, which complicates interpretation of results.

Biomarkers to assess exposure to PAHs at high levels of are well studied, but more work is needed to validate these biomarkers when exposure occurs at low, environmental, levels. At the group level, DNA adducts and particularly 1-hydroxypyrene seem to reflect well exposure even at low levels of air pollution. By contrast, protein adducts do not appear yet as valid markers to assess environmental exposure to B(a)P. The use of these biomarkers should be more widely implemented in combination with more traditional techniques to evaluate effects of ambient air pollution.

## ACKNOWLEDGMENTS

Supported by a CIRIT grant no. 1999SGR 00241 (Generalitat de Catalunya) and by the FIS. We thank Francisco Fernandez for statistical assistance.

## REFERENCES

1. Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Science of the total environment* 1997;199(1-2):141-9.
2. Mumtaz MM, George JD, Gold KW, Cibulas W, Derosa CT. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol.Ind.Health* 1996;12(6):742-971.
3. Ovrebo S, Fjeldstad PE, Grzybowska E, Kure EH, Chorazy M, Haugen A. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in a highly polluted area of Poland (Crawford et al., 1994). *Environmental health perspectives* 1995;103(9):838-43.
4. Zhao ZH, Quan WY, Tian DH. Urinary 1-hydroxypyrene as an indicator of human exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons in a coal-burning environment. *Science of the total environment* 1990;92:145-54.
5. Angerer J, Mannschreck C, Gundel J. Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *International archives of occupational and environmental health* 1997;70(6):365-77.
6. International Agency for Research on Cancer. Polynuclear aromatic compounds, Part 1, Chemical, environmental and experimental data. IARC Monogr Eval.Carcinog.Risk Chem.Hum. 1983;32:1-453.
7. Scherer G, Frank S, Riedel K, Meger-Kossien I, Renner T. Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9(4):373-80.
8. Vyskocil A, Fiala Z, Fialova D, Krajak V, Viau C. Environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Czech Republic. *Hum.Exp.Toxicol.* 1997;16(10):589-95.
9. Poirier MC, Weston A, Schoket B, Shamkhani H, Pan CF, McDiarmid MA et al. Biomonitoring of United States Army soldiers serving in Kuwait in 1991. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(6):545-51.
10. Mumford JL, Lee X, Lewtas J, Young TL, Santella RM. DNA adducts as biomarkers for assessing exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in tissues from Xuan Wei women with high exposure to coal combustion emissions and high lung cancer mortality. *Environmental health perspectives* 1993;99:83-7.
11. Peluso M, Merlo F, Munnia A, Valerio F, Perrotta A, Puntoni R et al. 32P-postlabeling detection of aromatic adducts in the white blood cell DNA of nonsmoking police officers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(1):3-11.

12. Lewtas J, Walsh D, Williams R, Dobias L. Air pollution exposure-DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses. *Mutat.Res.* 1997;378(1-2):51-63.
13. Binkova B, Lewtas J, Miskova I, Rossner P, Cerna M, Mrackova G et al. Biomarker studies in northern Bohemia. *Environ.Health Perspect.* 1996;104 Suppl 3:591-7.
14. Kang DH, Rothman N, Poirier MC, Greenberg A, Hsu CH, Schwartz BS et al. Interindividual differences in the concentration of 1-hydroxypyrene-glucuronide in urine and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells after charbroiled beef consumption. *Carcinogenesis* 1995;16(5):1079-85.
15. Kure EH, Andreassen A, Ovrebo S, Grzybowska E, Fiala Z, Strozyk M et al. Benzo(a)pyrene-albumin adducts in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in an industrial area of Poland. *Occup Environ Med* 1997;54(9):662-6.
16. Perera FP, Hemminki K, Gryzbowska E, Motykiewicz G, Michalska J, Santella RM et al. Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland (Perera et al., 1992) (Crawford et al., 1994). *Nature* 1992;360(6401):256-8.
17. Motykiewicz G, Michalska J, Pendzich J, Malusecka E, Strozyk M, Kalinowska E et al. A molecular epidemiology study in women from Upper Silesia, Poland. *Toxicol.Lett.* 1998;96-97:195-202.
18. Creasia DA, Poggenburg JK, Jr., Nettesheim P. Elution of benzo[alpha]pyrene from carbon particles in the respiratory tract of mice. *J Toxicol Environ Health* 1976;1(6):967-75.
19. Sun JD, Wolff RK, Kanapilly GM. Deposition, retention, and biological fate of inhaled benzo(a)pyrene adsorbed onto ultrafine particles and as a pure aerosol. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 1982;65(2):231-44.
20. Brzeznicki S, Jakubowski M, Czerski B. Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int.Arch.Occup.Environ.Health* 1997;70(4):257-60.
21. Jongeneelen FJ, Bos RP. Excretion of pyrene and hydroxypyrene in urine. *Cancer Lett.* 1990;51(2):175-9.
22. Buckley TJ, Liroy PJ. An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *Br J Ind Med* 1992;49(2):113-24.
23. Van Schooten FJ, Jongeneelen FJ, Hillebrand MJ, van Leeuwen FE, de Loeff AJ, Dijkmans AP et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cell DNA and 1-hydroxypyrene in the urine from aluminum workers:

- relation with job category and synergistic effect of smoking. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995;4(1):69-77.
24. Jacob J, Grimmer G, Raab G, Schmoldt A. The metabolism of pyrene by rat liver microsomes and the influence of various mono-oxygenase inducers. *Xenobiotica* 1982;12(1):45-53.
  25. Butler JD, Crossley P. An appraisal of relative airborne sub-urban concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons monitored indoors and outdoors. *Sci.Total Environ.* 1979;11(1):53-8.
  26. Jongeneelen FJ, Anzion RB, Henderson PT. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J Chromatogr.* 1987;413:227-32.
  27. Bouchard M, Pinsonneault L, Tremblay C, Weber JP. Biological monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in subjects living in the vicinity of a creosote impregnation plant. *Int.Arch.Occup.Environ.Health* 2001;74(7):505-13.
  28. Dor F, Dab W, Empereur-Bissonnet P, Zmirou D. Validity of biomarkers in environmental health studies: the case of PAHs and benzene. *Crit Rev.Toxicol.* 1999;29(2):129-68.
  29. Peluso M, Ceppi M, Munnia A, Puntoni R, Parodi S. Analysis of 13 (32)P-DNA postlabeling studies on occupational cohorts exposed to air pollution. *Am J Epidemiol* 2001;153(6):546-58.
  30. Motykiewicz G, Malusecka E, Grzybowska E, Chorazy M, Zhang YJ, Perera FP et al. Immunohistochemical quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lymphocytes. *Cancer Res* 1995;55(7):1417-22.
  31. Buckley TJ, Waldman JM, Dhara R, Greenberg A, Ouyang Z, Liou PJ. An assessment of a urinary biomarker for total human environmental exposure to benzo{a}pyrene. *International archives of occupational and environmental health* 1995;67(4):257-66.
  32. Ptashekas J, Ciuniene E, Barkiene M, Zurlyte I, Jonauskas G, Sliachtic N et al. Environmental and health monitoring in Lithuanian cities: exposure to heavy metals and benz(a)pyrene in Vilnius and Siauliai residents. *J.Environ.Pathol.Toxicol.Oncol.* 1996;15(2-4):135-41.
  33. Perico A, Gottardi M, Boddi V, Bavazzano P, Lanciotti E. Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in police in Florence, Italy, through personal air sampling and biological monitoring of the urinary metabolite 1-hydroxypyrene. *Arch.Environ.Health* 2001;56(6):506-12.
  34. Sithisarankul P, Vineis P, Kang D, Rothman N, Caporaso N, Strickland P. Association of 1-hydroxypyren-glucuronide in human urine with cigarette smoking and broiled or roasted meat consumption. *Biomarkers* 1997;2:217-21.

35. Siwinska E, Mielzynska D, Smolik E, Bubak A, Kwapulinski J. Evaluation of intra- and interindividual variation of urinary 1-hydroxypyrene, a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci.Total Environ.* 1998;217(1-2):175-83.
36. Zhao ZH, Quan WY, Tian DH. The relationship between polynuclear aromatic hydrocarbons in ambient air and 1-hydroxypyrene in human urine. *Journal of environmental science health* 1992;A27(7):1949-66.
37. Kanoh T, Fukuda M, Onozuka H, Kinouchi T, Ohnishi Y. Urinary 1-hydroxypyrene as a marker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in environment. *Environ.Res.* 1993;62(2):230-41.
38. Grzybowska E, Hemminki K, Chorazy M. Seasonal variations in levels of DNA adducts and X-spots in human populations living in different parts of Poland. *Environ.Health Perspect.* 1993;99:77-81.
39. Hemminki K, Zhang LF, Kruger J, Autrup H, Tornqvist M, Norbeck HE. Exposure of bus and taxi drivers to urban air pollutants as measured by DNA and protein adducts. *Toxicology letters* 1994;72(1-3):171-4.
40. Crawford FG, Mayer J, Santella RM, Cooper TB, Ottman R, Tsai WY et al. Biomarkers of environmental tobacco smoke in preschool children and their mothers {see comments}. *Journal of the National Cancer Institute* 1994;86(18):1398-402.
41. Binkova B, Lewtas J, Miskova I, Lenicek J, Sram R. DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population. *Carcinogenesis* 1995;16(5):1037-46.
42. Yang K, Airoidi L, Pastorelli R, Restano J, Guanci M, Hemminki K. Aromatic DNA adducts in lymphocytes of humans working at high and low traffic density areas. *Chem.Biol.Interact.* 1996;101(2):127-36.
43. Nielsen PS, Okkels H, Sigsgaard T, Kyrtopoulos S, Autrup H. Exposure to urban and rural air pollution: DNA and protein adducts and effect of glutathione-S-transferase genotype on adduct levels. *Int.Arch.Occup.Environ.Health* 1996;68(3):170-6.
44. Gundel J, Mannschreck C, Buttner K, Ewers U, Angerer J. Urinary levels of 1-hydroxypyrene, 1-, 2-, 3-, and 4-hydroxyphenanthrene in females living in an industrial area of Germany. *Archives of environmental contamination and toxicology* 1996;31(4):585-90.
45. Farmer PB, Sepai O, Lawrence R, Autrup H, Sabro NP, Vestergard AB et al. Biomonitoring human exposure to environmental carcinogenic chemicals. *Mutagenesis* 1996;11(4):363-81.



46. Cerna M, Pastorkova A, Myers SR, Rossner P, Binkova B. The use of a urine mutagenicity assay in the monitoring of environmental exposure to genotoxins. *Mutat.Res.* 1997;391(1-2):99-110.
47. Gilbert NL, Viau C. Biological monitoring of environmental exposure to PAHs in the vicinity of a Soderberg aluminium reduction plant. *Occupational and environmental medicine* 1997;54(8):619-21.
48. Hara K, Hanaoka T, Yamano Y, Itani T. Urinary 1-hydroxypyrene levels of garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci.Total Environ.* 1997;199(1-2):159-64.
49. Whyatt RM, Santella RM, Jedrychowski W, Garte SJ, Bell DA, Ottman R et al. Relationship between ambient air pollution and DNA damage in Polish mothers and newborns. *Environ.Health Perspect.* 1998;106 Suppl 3:821-6.
50. Merlo F, Andreassen A, Weston A, Pan CF, Haugen A, Valerio F et al. Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a marker for exposure to urban air levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(2):147-55.
51. Chuang JC, Callahan PJ, Lyu CW, Wilson NK. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposures of children in low-income families. *J.Expo.Anal.Environ.Epidemiol.* 1999;9(2):85-98.
52. Autrup H, Daneshvar B, Dragsted LO, Gamborg M, Hansen M, Loft S et al. Biomarkers for exposure to ambient air pollution--comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environmental health perspectives* 1999;107(3):233-8.
53. Pastorelli R, Guanci M, Restano J, Berri A, Micoli G, Minoia C et al. Seasonal effect on airborne pyrene, urinary 1-hydroxypyrene, and benzo(a)pyrene diol epoxide-hemoglobin adducts in the general population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(6):561-5.
54. Siwinska E, Mielzynska D, Bubak A, Smolik E. The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. *Mutat.Res.* 1999;445(2):147-53.
55. Tang D, Warburton D, Tannenbaum SR, Skipper P, Santella RM, Cereijido GS et al. Molecular and genetic damage from environmental tobacco smoke in young children. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(5):427-31.
56. Marafie EM, Marafie I, Emery SJ, Waters R, Jones NJ. Biomonitoring the human population exposed to pollution from the oil fires in Kuwait: analysis of placental tissue using (32)P-postlabeling. *Environmental and molecular mutagenesis* 2000;36(4):274-82.

57. Palli D, Vineis P, Russo A, Berrino F, Krogh V, Masala G et al. Diet, metabolic polymorphisms and dna adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study. *Int.J.Cancer* 2000;87(3):444-51.
58. Saint-Amour M, Tremblay C, Jacques L, Weber JP. [Biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among people living nearby an aluminum smelter in the province of Quebec]. *Rev.Epidemiol.Sante Publique* 2000;48(5):439-48.
59. Georgiadis P, Topinka J, Stoikidou M, Kaila S, Gioka M, Katsouyanni K et al. Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis* 2001;22(9):1447-57.
60. Staessen JA, Nawrot T, Hond ED, Thijs L, Fagard R, Hoppenbrouwers K et al. Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet* 2001;357(9269):1660-9.
61. Ruchirawa M, Mahidol C, Tangjarukij C, Pui-ock S, Jensen O, Kampeerawipakorn O et al. Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand-- particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers. *Sci.Total Environ.* 2002;287(1-2):121-32.
62. Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environmental health perspectives* 1996;104(11):1166-70.
63. Boleij J, Buringh B, Heederick D, Kromhout H. *Occupational Hygiene of Chemical and Biological Agents*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1995.
64. Ott WR. A physical explanation of the lognormality of pollutant concentrations. *J Air Waste Manage.Assoc.* 1990;40(10):1378-83.
65. Roggi C, Minoia C, Sciarra GF, Apostoli P, Maccarini L, Magnaghi S et al. Urinary 1-hydroxypyrene as a marker of exposure to pyrene: an epidemiological survey on a general population group. *Sci.Total Environ.* 1997;199(3):247-54.
66. Ballester DF, Tenias JM, Perez-Hoyos S. [The effects of air pollution on health: an introduction]. *Rev Esp.Salud Publica* 1999;73(2):109-21.
67. Kim H, Cho SH, Kang JW, Kim YD, Nan HM, Lee CH et al. Urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations in male Koreans. *Int.Arch.Occup.Environ.Health* 2001;74(1):59-62.
68. Clavel J, Mandereau L, Limasset JC, Hemon D, Cordier S. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and the risk of bladder cancer: a French case-control study. *Int.J Epidemiol.* 1994;23(6):1145-53.

69. Van Rooij JG, Van Lieshout EM, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Effect of the reduction of skin contamination on the internal dose of creosote workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scand.J Work Environ.Health* 1993;19(3):200-7.
70. Jongeneelen FJ, Bos RP, Anzion RB, Theuws JL, Henderson PT. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons. Metabolites in urine. *Scand.J Work Environ.Health* 1986;12(2):137-43.
71. Santodonato J, Howard P, Basu D. Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J Environ.Pathol.Toxicol.* 1981;5(1):1-364.
72. Rogge WF, Hildemann LM, Mazurek MA, Cass GR. Sources of fine organic aerosol. 2. Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy-dust diesel trucks. *Environ Sci Technol* 1993;27:636-51.
73. Whyatt RM, Bell DA, Jedrychowski W, Santella RM, Garte SJ, Cosma G et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human placenta and modulation by CYP1A1 induction and genotype. *Carcinogenesis* 1998;19(8):1389-92.
74. Pearce N, de Sanjose S, Boffetta P, Kogevinas M, Saracci R, Savitz D. Limitations of biomarkers of exposure in cancer epidemiology. *Epidemiology* 1995;6(2):190-4.
75. Dickey C, Santella RM, Hattis D, Tang D, Hsu Y, Cooper T et al. Variability in PAH-DNA adduct measurements in peripheral mononuclear cells: implications for quantitative cancer risk assessment. *Risk Anal.* 1997;17(5):649-56.
76. Phillips DH, Castegnaro M. Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 1999;14(3):301-15.

Podeu consultar l'article també aquí:

Castaño-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M. [\*Biomarkers of exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from environmental air pollution.\*](#) *Occupational and Environmental Medicine* 2004; 61(4):e12.

## ARTICLE 4

---

*Castaño-Vinyals G, Talaska G, Rothman N, Alguacil J, Garcia-Closas M, Dosemeci M, Cantor KP, Malats N, Real FX, Silverman D, Serra C, Carrato A, Tardon A, Garcia-Closas R, Kogevinas M, Vermeulen R. Bulky DNA adduct formation and risk of bladder cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2007, 16(10):2155-9..*

---

## RESUM

L'exposició a hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) s'ha associat amb el risc de càncer de bufeta urinària i amb nivells elevats d'aductes voluminosos d'ADN en varis estudis, principalment en fumadors. Vam investigar la relació entre aductes voluminosos de PAHs-ADN en cèl·lules mononuclears de sang perifèrica i càncer de bufeta en individus no fumadors d'un gran estudi cas-control de base hospitalària a Espanya. A més a més, vam estudiar l'associació entre la formació d'aductes d'ADN i varis indicadors de contaminació atmosfèrica. L'estudi es va compondre de 76 casos no fumadors i 76 controls emparellats individualment per sexe, regió de residència, edat, i condició respecte el tabac (ex-fumador o persones que mai han fumat). Per tal de maximitzar la rellevància de la mesura dels aductes d'ADN com a indicador de l'exposició a PAHs, es van seleccionar individus que no havien canviat el seu lloc de residència, feina i factors importants del seu estil de vida durant els últims 10 anys. Els aductes voluminosos d'ADN van ser mesurats amb la tècnica del radio-etiquetatge amb fòsfor-32, i amb tractament de nucleasa P1. El percentatge d'aductes detectables en els controls (41%) era més gran que en els casos (32%), amb una OR de 0.75 (95%CI 0.36-1.58). En una anàlisi limitada als controls, es va trobar un percentatge més alt d'aductes d'ADN en individus en què la seva última residència havia estat una gran ciutat (50%) respecte els què havien viscut en un poble (19%); p-valor=0,04. No es van

trobar altres associacions consistents per la resta de marcadors de contaminació atmosfèrica. En aquest estudi d'individus no fumadors i amb un estil de vida i factors ambientals estables, els aductes voluminosos d'ADN no estan associats al risc de càncer de bufeta. Aquests resultats no recolzen una associació entre el risc de càncer de bufeta i l'exposició a nivells baixos de PAHs, mesurat a través de la formació d'aductes voluminosos d'ADN cèl·lules mononuclears perifèriques.

---

**Bulky DNA adduct formation and risk of bladder cancer**

---

**Gemma Castaño-Vinyals**

*Centre for Research in Environmental Epidemiology; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain*

**Glenn Talaska**

*Department of Environmental Health, University of Cincinnati, OH, USA*

**Nathaniel Rothman**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA*

**Juan Alguacil**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA; and Área de Medicina Preventiva, Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública, Universidad de Huelva, Huelva, Spain;*

**Montse Garcia-Closas**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA*

**Mustafa Dosemeci , Kenneth P. Cantor**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA*

**Núria Malats**

*Centre for Research in Environmental Epidemiology; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain*

**Francisco X Real**

*Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain;*

**Debra Silverman,**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA*

**Consol Serra**

*Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; and Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain*

**Alfredo Carrato**

*Hospital General de Elche, Elche, Spain*

**Adonina Tardon**

*Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain*

**Reina Garcia-Closas**

*Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife, Spain*

**Manolis Kogevinas**

*Centre for Research in Environmental Epidemiology; Municipal Institute of Medical Research, Barcelona, Spain; and Department of Social Medicine, Medical School, University of Crete. Herakleion, Crete, Greece; and CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Barcelona, Spain.*

**Roel Vermeulen**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, USA; and Institute of Risk Assessment Sciences, University of Utrecht, The Netherlands*

**Key words:** adducts, bladder cancer, polycyclic aromatic hydrocarbons, non-smokers, air pollution

## ABSTRACT

Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) has been associated with risk of bladder cancer and with increased bulky DNA adduct levels in several studies, mainly in smokers. We investigated the relation between bulky PAH-DNA adducts in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and bladder cancer in non-smoking subjects from a large hospital-based case-control study in Spain. Additionally, we examined the association between DNA adduct formation and several air pollution proxies. The study comprised 76 non-smoking cases and 76 individually matched controls by sex, region of residence, age, and smoking status (never, former). To maximize the relevance of the DNA adduct measurement as a proxy of PAH-exposure, subjects selected had not changed residence, occupation and major lifestyle factors during the last 10 years. Bulky DNA adducts were measured using the 32P-postlabeling technique, nuclease P1 treatment. The percentage of detectable adducts was higher in controls (41%) than in cases (32%) with an OR of 0.75 (95%CI 0.36-1.58). In an analysis limited to controls, a higher percentage of DNA adducts was found among those whose last residence was in a big city (50%) compared to those living in villages (19%);  $p$ -value=0.04. No consistent associations were found for other markers of air pollution. In this study among non-smokers with stable environmental and lifestyle factors, bulky DNA adducts were not associated with bladder cancer risk. Results do not support an association of bladder cancer risk with low level exposure to PAHs, as measured through the formation of bulky DNA adducts in peripheral mononuclear cells.

## INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), formed during incomplete combustion, are ubiquitous in the environment and account for an important proportion of atmospheric

pollution due to traffic, heating and industry emissions. Exposure to PAHs occurs mainly through smoking (active and passive), diet, inhalation of polluted air and dermal contact in certain occupations and activities (1;2).

There is evidence suggesting an association between PAHs and bladder cancer in humans (3). Excess risk of bladder cancer has been observed frequently among drivers of trucks, buses, or taxi cabs (4;5) and among aluminum workers (6;7). Although, these occupational settings have exposure to PAHs they also contain exposure to nitro-PAHs and in the case of aluminum workers also aromatic amines making it difficult to attribute the elevated risk specifically to PAHs. PAH-exposure has been related with bulky DNA-adduct levels (8) and as a logical extension should therefore be related to bladder cancer risk if PAH exposure is associated with the disease. In a recent study, however, such a relation was not found, except among current smokers (9).

To further investigate the potential association between PAH exposure and bladder cancer we investigated the relation of bulky DNA adduct levels in mononuclear cells, measured by <sup>32</sup>P-postlabeling and bladder cancer risk among non-smoking participants of a hospital based case-control study. We selected only non-smokers so as to avoid possible confounding by smoking, as smoking is related to bulky DNA adducts and to bladder cancer by mechanisms that are not specific to PAH exposure (10;11).

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Selection of subjects**

The Spanish Bladder Cancer Study is a hospital-based case control study conducted from 1998 to 2001 that enrolled 1219 cases and 1271 controls from 18 hospitals in 5 regions of Spain (Barcelona, Valles/Bages, Alicante, Tenerife and Asturias) (12). Cases were patients newly diagnosed with and histologically confirmed bladder cancer. Controls were patients admitted to the participating hospitals with diagnoses thought



to be unrelated to the exposure of interest, mainly trauma and minor surgery. Controls were individually matched with cases by 5-years categories, sex, and region.

Information on lifestyle factors was obtained using computer-aided personal interview (CAPI) administered at the hospital. Information was collected on tobacco use, lifetime occupational and residential history, environmental exposures and other potential bladder carcinogens. Information on dietary habits was obtained through a food frequency questionnaire. The participation rate for the CAPI was 85%, 96% of subjects who completed the interview gave a blood sample.

A subgroup of the total study subjects was selected for DNA adduct analysis. After limiting the population to subjects with at least 40 million lymphocytes available, were non-smokers or former smokers for at least 10 years before interview, had not changed their residence or occupation (for those employed) during the 10 years prior to interview/diagnosis, we ended up with 158 cases (29 women) and 228 controls (20 women). Out of the eligible subjects, 76 cases (65 males, 11 females) were randomly selected and individually matched to 76 controls by sex, age, smoking status -former (for more than 10 years) or never smoker, and region (when possible). Each region comprises wide geographical areas with both rural and urban environments, so as to avoid having cases and controls coming from very similar environments.

### **DNA extraction and <sup>32</sup>P-postlabeling**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the whole blood using a Ficoll gradient and cryopreserved in DMSO. DNA was extracted from the PBMCs using the chloroform:isoamyl alcohol method (13).

DNA samples were analyzed in duplicate using the <sup>32</sup>P-Postlabeling technique with nuclease P1 enrichment (14). In addition, blind duplicates were randomly inserted for quality control purposes. DNA (4 µg) was hydrolyzed by incubation for 3 hr at 37°C using 2.5 units of micrococcal endonuclease (Sigma) and 0.25 µg of calf spleen phosphodiesterase (Sigma). Nuclease P1 was added (0.75 units) to the digested DNA and samples were again incubated for 40 min at 37°C to enhance the sensitivity of the assay. Labeling of adducted nucleotides was performed by adding 50 µCi per sample of <sup>32</sup>P-ATP and incubating with T4 Polynucleotide Kinase (5 U/µl) for 40 min at 37°C. Two µl of potato apyrase was added to the mixture and incubated for 40 min at 37°C to hydrolyze any unreacted ATP. Eighty percent of the sample volume was spotted on a

10x10 cm PEI-cellulose plate, and adducts were mapped with a 3-directional thin layer chromatography using 1) 0.65 M sodium phosphate, pH 6.0; 2) 3.6 M lithium formate, 8.5 M urea; and 3) 0.8 M lithium chloride, 0.5 M tris HCl, 8.5 M urea, pH 8.0. Plates were developed in 1.5 M sodium phosphate, pH 6.

DNA adducts were visualized by autoradiography and quantified using Cerenkov counting. The first spot detected was assigned number 1, and each spot detected in the same position was equally labeled. Other spots detected in different positions in the chromatogram were numbered consecutively according to each new appearance in the plates. Plates were placed in autoradiography cassettes containing intensifying screens and exposed at -80°C for 48 hours. Spots were excised from the plates and counted in plastic scintillation vials containing 5 ml 70% ethanol. Appropriate blank areas of the chromatogram were also excised to provide a background adjustment.

Calculation for relative adduct labeling (RAL) was done using the following formula (14):

$$RAL = \frac{\text{adductCountPerMinute}(CPM) \times 10^6}{1.25 \times 10^6 \text{ cpm} / \text{pmol}(ATP) \times 3240 \text{ pmol}(dNP) / \mu\text{gDNA}}$$

A BPDE-DNA adduct standard was run with the samples as a positive control. B(a)P-dG-3'-monophosphate was supplied by the National Cancer Institute, Division of Cancer Biology, Chemical and Physical Carcinogenesis Branch (64 FR 72090).

### Statistical analyses

Samples were assayed blind to case-control status. Adduct CPM results were corrected for background radioactivity by taking the average background CPM level of TLC plates in the same run (n=16). Limit of detection (LOD) of the <sup>32</sup>P-postlabeling was calculated based on the observed variability in the background CPM levels (LOD=3 times the standard deviation (SD)). LOD was 25 CPM (corresponding to ~1 RAL) and thus adduct CPM levels above 1 RAL, after background correction, were considered detectable. The median coefficient of variation (CV) between blinded duplicates (14 pairs) for adduct 1, adduct 3 and total adducts was 31%, 42% and 35%, respectively.

The intraclass correlation coefficient (ICC) of adduct 1, adduct3 and total adducts was 0.96, 0.90 and 0.89, respectively.

Conditional logistic regression was used to estimate the association of bulky DNA adducts with risk of bladder cancer. Analyses were based on the presence ( $\geq 1$  RAL) or absence ( $< 1$  RAL) of adducts (yes/no) and as continuous measure after log-transformation. In these analyses non-detectable adduct levels were substituted with the LOD (1 RAL) divided by the square root of two. Odd Ratios (OR) were adjusted for *a priori* high-risk occupations (metal workers, hairdressers and barbers, painters, chemical, leather, transport and rubber industries) (5). Differences in adduct levels due to lifestyle and environmental exposures were analyzed only among the controls by the Wilcoxon Two Sample test and the Student T-test. Statistical analyses were carried out using Stata software, version 8.2. Diet was also evaluated in relation with adduct levels. As we did not find any association of adducts levels with fruit and vegetable intake, estimated BaP or heterocyclic amines (MeIQx, DiMeIQx and PhIP) intake results are not presented.

## RESULTS

Table 1 presents the main characteristics of the study population. The distribution of the study population by gender was similar to that of the Spanish Bladder Cancer Study, with 86% males, and a mean age of 70 years.

Adduct 1 and adduct 3 (numbering based on first occurrence in the experiments) were the most prevalent adducts, with 32% and 9% of detectable adducts respectively. These two spots coincided with the two main spots of the BPDE standard. The remaining spots (N=5) represented less than 5 % of detectable adducts in the samples, and were not analyzed individually.

Table 1. Main characteristics of the study population

	<b>Cases (n=76)</b>	<b>%</b>	<b>Controls (n=76)</b>	<b>%</b>
Gender, male	65	86%	65	86%
Age, mean (sd*)	71 (9)		70 (10)	
Male	71 (6)		71 (6)	
Female	68 (10)		65 (11)	
Region				
Barcelona	10	13%	9	12%
Valles/Bages	12	16%	14	18%
Alicante	5	7%	3	4%
Tenerife	13	17%	10	13%
Asturias	36	47%	40	53%
Education				
Less than primary school	39	52%	44	58%
Primary school	28	37%	27	36%
High school or higher	8	11%	4	5%
Other	0	0%	1	1%
Missing	1		0	
Smoking				
Never smokers	31	41%	31	41%
Former smokers	45	59%	45	59%

Notes. \*sd: standard deviation

Cases and controls were matched by sex, age and smoking status (former or never smoker). Controls were also matched to cases by region of residence whenever possible.

Table 2 shows the percentage of individuals with detectable adducts stratified by cases status, median RAL level and the corresponding 10<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> percentiles of adducts among the subjects in whom adduct levels were detectable. For adduct 1, adduct 3 and total adducts, percentage individuals with detectable levels was lower in cases than in controls, showing odds ratios below 1, albeit none of the differences were statistically significant. When using the logarithm of the levels of adducts instead of the dichotomous variable of detectable vs. non-detectable adducts, the results were essentially similar (data not shown).

Table 2. Percentage of detectable adducts and median adduct levels (*only for the detectables*) for adduct 1 and 3 and total adducts and conditional logistic regressions.

	cases (n=76)		controls (n=76)		OR (95% CI)
	% detectable adducts	median RAL (10 <sup>th</sup> -90 <sup>th</sup> percentile)	% detectable adducts	median RAL (10 <sup>th</sup> -90 <sup>th</sup> percentile)	
Adduct 1	29%	1.5 (1.1- 64.9)	36%	1.8 (1.2- 5.5)	0.86 (0.43-1.74)
Adduct 3	4%	5.7 (1.1 - 6.9)	13%	1.7 (1.2- 9.3)	0.15 (0.02-1.18)
Total adducts	32%	1.5 (1.1 - 83.9)	41%	2.5 (1.3- 9.7)	0.75 (0.36-1.58)

Note: matching variables: age, gender, region and smoking status (never/former); adjusted for high risk occupations

Note 2: The other adducts (2, and 4 to 7) were not considered because of their low frequencies of detectable adducts

RAL expressed as adducted nucleotides per 10<sup>9</sup> normal nucleotides

DNA adducts were also analyzed among controls as possible markers of exposure to air pollution among the general population. Table 3 shows the percentage of individuals with detectable adduct levels according to three of the variables of air pollution studied: proximity to industries, windows facing traffic and size of the city of residence. We show both lifetime indices as well as air pollution indices for the last residence (average duration in last residence is 40 years). Only the size of the city showed a small increase in the percentage of detectables for subjects living more than 40 years in a big city or metropolitan area compared to those subjects who spend more than 25 years in a small village (from 50 to 19% respectively considering only the last residence; and from 57% to 33% respectively taking into account the life-time index).

Table 3. Comparison of air pollution variables with percentage of detectable adducts, both life-time and last residence variables. Only **controls** are included in the analysis.

	n total	Level of exposure to air pollution variables			p-value (chi-square)	p-value (trend)
		Low N (%) detectables)	Intermediate N (%) detectables)	High N (%) detectables)		
<b>Life-time exposure</b>						
Having an industry close to the residence	76	46 (39%)	11 (27%)	19 (52%)	0.370	0.413
Having windows facing traffic street at home	76	44 (43%)	15 (47%)	17 (29%)	0.541	0.400
Size of the city of residence	75	30 (33%)	24 (38%)	21 (57%)	0.212	0.102
<b>Last residence</b>						
Having an industry close to the residence	62	51 (43%)	2 (100%)	9 (11%)	0.042	0.143
Having windows facing traffic street at home	62	37 (43%)	12 (58%)	13 (15%)	0.076	0.171
Size of the city of residence	74	21 (19%)	43 (51%)	10 (50%)	0.040	0.037

Low exposure: 1) no industries in the proximity of the residence, 2) not having windows facing traffic street and 3) >25 years living in a small village

High exposure: 1) >30 years living close to an industry, 2) >30 years with windows facing a traffic street and 3) >40 years living in a big city.

Intermediate exposure: Subjects that did not fit in any of the two categories (e.g. low, high) were classified as "intermediate exposed".

## DISCUSSION

We examined bulky DNA adducts in peripheral mononuclear cells of non-smoking bladder cancer cases and controls, who were selected among subjects with a stable life style in relation to place of residence and occupation in the past 10 years.

This selection strategy was chosen in order to increase the historical relevance of the measured adduct levels and thus reduce the inherent exposure misclassification. All subjects included in the study were never or long-term former smokers. No difference in adduct levels was observed between these two groups and risk-analyses stratified by smoking status resulted in similar observations. Controls tended to have a higher percentage of detectable adduct levels than cases, but differences were not statistically significant. These results are consistent with a previous study among non-smokers (9) and seem to indicate that DNA-adducts measured in mononuclear cells are not associated with bladder cancer risk. Our finding might be also in keeping with those for lung cancer. Tang et al., 2001 (11) found a relation between carcinogen-DNA

adducts and lung cancer only among current smokers but not among former and non-smokers. They concluded that DNA-adduct levels could serve as a measure of biological susceptibility, which would manifest most clearly while exposure is ongoing.

In addition, we evaluated bulky DNA adducts as a biomarker of exposure, with the nuclease P1 method of  $^{32}\text{P}$ -postlabeling which has been shown to be sensitive to many PAH carcinogen DNA adducts (15). A meta-analysis of grouped data had previously shown a correlation between low level BaP exposure and level of DNA adducts (16), but not at the individual level. In our study, one of the criteria used for the selection of subjects was not having changed the residence in the past 10 years. Living in the proximity of an industrial plant or having windows facing a traffic street did not seem to be associated with the level of DNA adducts. Size of the city of residence, as a proxy for living in an urban or rural setting was positively correlated with the percentage of detectable adducts, especially when taking into account the last residence rather than life-time residences. PAHs in air originate mainly from traffic exhaust (17). Unfortunately, no quantitative data was available on traffic intensity to further explore this potential association. Besides differences in air quality the size of the city could also reflect differences in lifestyles between urban and more rural environments, even though we have explored and/or adjusted for the main factors that can influence the results, such as smoking, diet and occupation.

The upper CIs of ORs for adduct associations decrease the probability of a substantial effect (upper 95% CI  $\sim 1.6$ ) of PAH on risk of bladder cancer in this population, which was presumably exposed to relatively low levels of PAHs. We cannot exclude that the absence of a relation between DNA-adducts and bladder cancer risk is partly due to exposure misclassification resulting most likely in a bias towards the null. However, reliability of our measurements was high with ICCs between 0.89 to 0.96. The coefficient of variation (CV), on the other hand, was around 35%, but was similar in cases and controls, and therefore odds ratios and other comparisons between these two groups should not have been biased. Due to the hospital based case-control design of the study subjects might have changed their usual lifestyle habits due to illness. However, subjects were enrolled quickly after hospital admission and as such the

potential changes in dietary habits will probably not have influenced the results to a large extent. Especially as we measured bulky DNA adducts in mononuclear cells which have an estimated half-life of at least several weeks to a few months (18).

In conclusion, despite the small numbers, our study is one of the few studies of DNA adducts and bladder cancer risk among non-smokers. We reported that bulky DNA adducts were not associated with bladder cancer risk in this carefully selected population of non-smokers with stable lifestyles. Results from this study do not support an association of bladder cancer risk with low level exposure to PAHs measured through the formation of bulky DNA adducts, at least among non-smokers.

#### **ABBREVIATIONS**

BaP: benzo(a)pyrene; BPDE: benzo(a)pyrene diol epoxide; CPM: counts per minute; DiMeIQx: 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline; DMSO: dimethylsulfoxide; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; MeIQx: 2-Amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] quinoxaline; PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PBS: phosphate-buffered saline; PEI: Polyethyleneimine; PhIP: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine; RAL: Relative Adduct Labelling; RNAase: Ribonuclease; SDS: sodium dodecyl sulfate; SSC: Sodium citrate.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

A special thanks to Brenda Schumann for her help in the laboratory. We thank Robert C. Saal from Westat, Rockville, MD, Leslie Carroll and Eric Boyd from IMS, Silver Spring, MD, and Paco Fernández, IMIM, Barcelona, for their support in study and data management; Dr. Montse Torà for the coordination of biological samples; Dr. Maria Sala from IMIM, Barcelona, for her work in data collection; physicians, nurses, interviewers (Ana Alfaro, Cristina Villanueva, Cristina Pipó, Joan Montes, Iolanda Velez, Pablo Hernández, Ángeles Pérez, Carmen Benito, Adela Castillejo, Elisa Jover, Natalia Blanco, Avelino Menéndez, Cristina Arias, Begoña Argüelles) and all participants in the study for their efforts during field work.



This research was primarily supported by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute, Division of Cancer Epidemiology and Genetics (NCI Contract No.NO2-CP-11015). This project was also funded by the Spanish Ministry of Health (FIS 2001-2002), the EPICUR-red (ISIII-GO3/174) and the European Union (Environment and genetic factors in bladder cancer: a multicentric case-control study in Europe. BIOMED. 1998-2001 / Environmental Cancer Risk Nutrition and Individual Susceptibility (ECNIS). FP6. FOOD-CT-2005-513943).

## REFERENCES

1. Santodonato J, Howard P, Basu D. Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J Environ Pathol Toxicol* 1981; 5(1):1-364.
2. Mumtaz MM, George JD, Gold KW, Cibulas W, Derosa CT. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol Ind Health* 1996; 12(6):742-971.
3. Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997; 8(3):444-472.
4. Colt JS, Baris D, Stewart P, Schned AR, Heaney JA, Mott LA et al. Occupation and bladder cancer risk in a population-based case-control study in New Hampshire. *Cancer Causes Control* 2004; 15(8):759-769.
5. Kogevinas M, 't Mannetje A, Cordier S, Ranft U, Gonzalez CA, Vineis P et al. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control* 2003; 14(10):907-914.
6. Romundstad P, Haldorsen T, Andersen A. Cancer incidence and cause specific mortality among workers in two Norwegian aluminum reduction plants. *Am J Ind Med* 2000; 37(2):175-183.
7. Spinelli JJ, Band PR, Svirchev LM, Gallagher RP. Mortality and cancer incidence in aluminum reduction plant workers. *J Occup Med* 1991; 33(11):1150-1155.

8. Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206(1):73-93.
9. Peluso M, Munnia A, Hoek G, Krzyzanowski M, Veglia F, Airoidi L et al. DNA adducts and lung cancer risk: a prospective study. *Cancer Res* 2005; 65(17):8042-8048.
10. Veglia F, Matullo G, Vineis P. Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12(2):157-160.
11. Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S et al. Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 2001; 61(18):6708-6712.
12. Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005; 366(9486):649-659.
13. Wiencke JK, Thurston SW, Kelsey KT, Varkonyi A, Wain JC, Mark EJ et al. Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung. *Journal of the National Cancer Institute* 1999; 91(7):614-619.
14. Reddy MV, Randerath K. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 1986; 7(9):1543-1551.
15. Gupta RC, Earley K. 32P-adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis* 1988; 9(9):1687-1693.
16. Castano-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup Environ Med* 2004; 61(4):e12.
17. Sharma H, Jain VK, Khan ZH. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. *Chemosphere* 2007; 66(2):302-310.

18. Wiencke JK, Kelsey KT, Varkonyi A, Semey K, Wain JC, Mark E et al. Correlation of DNA adducts in blood mononuclear cells with tobacco carcinogen-induced damage in human lung. *Cancer Res* 1995; 55(21):4910-4914.

Podeu consultar l'article també aquí:

Castaño-Vinyals G, Talaska G, Rothman N, Alguacil J, Garcia-Closas M, Dosemeci M, Cantor KP, Malats N, Real FX, Silverman D, Serra C, Carrato A, Tardon A, Garcia-Closas R, Kogevinas M, Vermeulen R. [\*Bulky DNA adduct formation and risk of bladder cancer\*](#). *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 2007, 16(10):2155-9..

## ARTICLE 5

---

García-Closas M, Malats N, Real FX, Welch R, Kogevinas M, Chatterjee N, Pfeiffer R, Silverman D, Dosemeci M, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, **Castaño-Vinyals G**, Chanock S, Yeager M, Rothman N. Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2006; 15(3):536-42.

---

## RESUM

La reparació per excisió de nucleòtids (NER) és crítica per a protegir contra el dany dels carcinògens del fum del tabac. Vam avaluar la influència de variacions genètiques comuns en la via de la NER en el risc de càncer de bufeta, analitzant 22 polimorfismes d'un sòl nucleòtid (SNP) en set gens de la via del NER (XPC, RAD23B, ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5 i ERCC6). La nostra població d'estudi incloïa 1150 pacients amb carcinoma de cèl.lules transicionals de la bufeta urinària i 1149 controls d'Espanya. Les raons d'odds (OR) i els intervals de confiança del 95 % (95% CI) van ser ajustats per edat, sexe, regió i condició respecte al tabac. Els individus amb el genotip variant pels SNPs en quatre dels set gens avaluats tenien un petit increment en el risc de càncer de bufeta comparat amb individus amb el genotip homozigot salvatge: RAD23B IVS5-15A>G (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.5; P = 0.01), ERCC2 R156R (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.6; P = 0.006), ERCC1 IVS5+33A>C (OR, 1.2; 95% CI, 1.0-1.5; P = 0.06; Ptrend = 0.04), and ERCC5 M254V (OR, 1.4; 95% CI, 1.0-2.0; P = 0.04). Una anàlisi global dels efectes de la via indicava que la variació genètica en la NER caracteritzada pels 22 SNPs analitzats en aquest estudi predeu significativament el risc de càncer de bufeta (P=0,04). La comparació per parells suggeria que ser portador de variants en dos gens pot resultar en un increment substancial del risc. L'anàlisi amb un arbre de classificació suggeria la presència de subgrups d'individus definits per l'hàbit tabàquic i els genotips de la NER que podrien tenir un increment substancial del risc. En conclusió, aquests resultats donen suport a la influència de la variació genètica de la NER en el risc de càncer de

bufeta. Una caracterització detallada de la variació genètica en gens claus de la NER està justificada i pot ajudar, en última instància, a identificar variants de susceptibilitat múltiples que poden ser responsables per a increments substancials conjunts del risc.

---

**Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway  
and bladder cancer risk**

---

**Montserrat García-Closas**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD*

**Núria Malats**

*Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain*

**Francisco X. Real**

*Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain; and Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain*

**Robert Welch**

*Core Genotype Facility at the Advanced Technology Center of the National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD*

**Manolis Kogevinas**

*Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain*

**Nilanjan Chatterjee, Ruth Pfeiffer, Debra Silverman, Mustafa Dosemeci**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD*

**Adonina Tardón**

*Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain*

**Consol Serra**

*Consorci Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Spain*

**Alfredo Carrato**

*Hospital Universitario de Elche, Elche, Spain*

**Reina García-Closas**

*Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Canarias, La Laguna, Spain*

**Gemma Castaño-Vinyals**

*Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain*

**Stephen Chanock**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD; and Core Genotype Facility at the Advanced Technology Center of the National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD*

**Meredith Yeager**

*Core Genotype Facility at the Advanced Technology Center of the National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD*

**Nathaniel Rothman**

*Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD*

## ABSTRACT

Nucleotide excision repair (NER) is critical for protecting against damage from carcinogens in tobacco smoke. We evaluated the influence of common genetic variation in the NER pathway on bladder cancer risk by analyzing 22 single nucleotide polymorphisms (SNP) in seven NER genes (XPC, RAD23B, ERCC1, ERCC2, ERCC4, ERCC5, and ERCC6). Our study population included 1,150 patients with transitional cell carcinoma of the urinary bladder and 1,149 control subjects from Spain. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) were adjusted for age, gender, region, and smoking status. Subjects with the variant genotypes for SNPs in four of the seven genes evaluated had small increases in bladder cancer risk compared to subjects with the homozygous wild-type genotypes: RAD23B IVS5-15A>G (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.5;  $P = 0.01$ ), ERCC2 R156R (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.6;  $P = 0.006$ ), ERCC1 IVS5+33A>C (OR, 1.2; 95% CI, 1.0-1.5;  $P = 0.06$ ;  $P_{\text{trend}} = 0.04$ ), and ERCC5 M254V (OR, 1.4; 95% CI, 1.0-2.0;  $P = 0.04$ ). A global test for pathway effects indicated that genetic variation in NER characterized by the 22 SNPs analyzed in this study significantly predicts bladder cancer risk ( $P = 0.04$ ). Pairwise comparisons suggested that carrying variants in two genes could result in substantial increases in risk. Classification tree analyses suggested the presence of subgroups of individuals defined by smoking and NER genotypes that could have substantial increases in risk. In conclusion, these findings provide support for the influence of genetic variation in NER on bladder cancer risk. A detailed characterization of genetic variation in key NER genes is warranted and might ultimately help identify multiple susceptibility variants that could be responsible for substantial joint increases in risk.

## INTRODUCTION

The importance of nucleotide excision repair (NER) in protection against cancer has been evident because of the discovery of cancer-prone syndromes, such as xeroderma pigmentosum, which result from rare germ line mutations in NER genes (1). NER is a complex and versatile mechanism that consists of the following critical steps (2): (a) damage recognition that differs depending on whether the damage is in

transcriptionally silent (global genome repair involving XPC-RAD23B complex, XPA, and RPA) or transcriptionally active (transcription coupled repair involving a large protein complex, including CSA and ERCC6 proteins); (b) local unwinding of the DNA helix around the lesion by the transcription factor IIIH complex that contains two DNA helicases (XPB and ERCC2); (c) dual incision of oligonucleotide containing the damage by 5' (ERCC1-ERCC4 complex) and 3'(ERCC5) endonucleases; and (d) repair of the nucleotide gap by DNA synthesis using the opposite normal DNA strand as a template which requires DNA polymerases ( $\delta$  or  $\epsilon$ ) and the accessory replication proteins: proliferating cell nuclear antigen, RPA, and RFC. This mechanism can repair a wide range of DNA lesions, including bulky DNA adducts caused by aromatic amines and other carcinogens in tobacco smoke (2). This suggests that common genetic variation in NER might influence the risk of smoking-related cancers, such as bladder cancer (3).

Functional studies in humans have shown that common variation in NER genes can affect the capacity to repair DNA (4-6), and epidemiologic studies have provided some evidence supporting their role in the pathogenesis of smoking-related cancers (3, 7). A few epidemiologic studies, including a range of 124 to 547 cases per study, have evaluated associations with bladder cancer risk (8-13). The gene that has been most studied is ERCC2 (excision repair cross-complementary group 2), previously named XPD, which codes for a DNA helicase subunit of the core transcription factor IIIH essential for NER and transcription (2). Specifically, five case-control studies of bladder cancer evaluated a nonsynonymous variant (K751Q) in ERCC2 and found no significant associations with bladder cancer risk (8, 10-13). Other single nucleotide polymorphisms (SNP) that have been evaluated in relation to bladder cancer risk include ERCC2 D312N (10); XPC K939Q, PAT, and IVS11-6 (8, 9); and ERCC5, previously named XPG D1104H (8). The only statistically significant findings were from a Swedish study of 327 cases and same number of controls that found an increased risk for ERCC5 K939Q homozygous variants and reduced risk for ERCC5 D1104H homozygous variants (8).

Common variation in individual genes in a complex pathway involving multiple genes, such as NER, is unlikely to have strong associations with cancer risk. Previous studies of NER and bladder cancer had limited statistical power to evaluate small to



modest associations; thus, studies of larger sample sizes are required to further evaluate this critical pathway. We evaluated the influence of genetic variation in the NER pathway on bladder cancer risk among 1,150 cases and 1,149 controls participating in the Spanish Bladder Cancer Study. Specifically, we analyzed 22 genetic variants in seven NER genes [XPC, RAD23B, ERCC6 (previously named CSB), ERCC2, ERCC5, ERCC1, and ERCC4 (previously named XPF)].

## MATERIALS AND METHODS

### Study Population

The study population has been previously described (14). Briefly, cases were patients participating in the Spanish Bladder Cancer Study diagnosed with histologically confirmed carcinoma of the urinary bladder in 1998 to 2001, ages 21 to 80 years (mean F SD = 66 F 10 years), of which 87% were males. Controls were selected from patients admitted to participating hospitals for diagnoses believed to be unrelated to the exposures of interest, individually matched to the cases on age at interview within 5-year categories, gender, ethnicity, and region. Demographic and risk factor information was collected at the hospitals using computer-assisted personal interviews. Dietary data were collected with a food frequency questionnaire and nutrient composition of foods, including folic acid, was obtained from a Spanish food composition table (15).

Eighty-four percent of eligible cases and 88% of eligible controls agreed to participate in the study and were interviewed. Of the 1,219 cases and 1,271 controls interviewed, 1,188 (97%) cases and 1,173 (92%) controls provided a blood or buccal cell sample for DNA extraction. Seven cases and 11 controls were excluded because of low amounts of DNA. To reduce heterogeneity, 16 cases with neoplasias of nontransitional histology and six non-Caucasian subjects (5 cases and 1 control) were excluded from the analyses. Fifteen subjects (7 cases and 8 controls) with missing smoking status information and seven subjects (3 cases and 4 controls) with DNA quality control problems were also excluded from the analyses. Thus, the final study population available for analysis included 1,150 cases and 1,149 controls. We obtained informed

consent from potential participants in accordance with the National Cancer Institute and local institutional review boards.

Subjects were categorized as never smokers (29% of controls) if they smoked <100 cigarettes in their lifetime, and ever smokers otherwise. Ever smokers were further classified as regular smokers (63% of controls) if they smoked one cigarette per day for 6 months or longer, and occasional smokers (8% of controls) otherwise. Of the regular smoker controls, 37% were current smokers (i.e., they smoked within a year of the reference date), and 63% were former smokers. Most (81%) regular smoker controls with information on whether they smoked black or blond tobacco (information available in 82% of controls) reported smoking black tobacco (48% smoked black tobacco only and 33% both tobacco types).

### **Genotyping**

DNA for genotype assays was extracted from leukocytes using the Puregene DNA Isolation kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN) for most cases (n = 1,107) and controls (n = 1,032) included in the analysis. DNA from an additional 43 cases and 117 controls was extracted from mouthwash samples using a phenol-chloroform extraction. We selected 22 SNPs in seven NER genes (Table 1) with an expected rare allele frequency in Caucasians of >5% and assays available at Core Genotyping Facility of the Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute at the time of analysis. Selection favored nonsynonymous SNPs, those previously evaluated in relation to bladder cancer risk, or those with evidence for functional significance. Genotype assays were done at the Core Genotyping Facility using randomly sorted DNA samples from cases and controls, including duplicate samples for quality control. Description and methods for each genotype assay can be found at <http://snp500cancer.nci.nih.gov> (16).

All genotypes under study were in Hardy-Weinberg equilibrium in the control population, except for a slightly higher than expected frequency of homozygous variants for RAD23B IVS5-57A>T (3% versus 2%,  $P = 0.01$ ), ERCC4 R415Q (2% versus 1%,  $P = 0.01$ ), and ERCC4 IVS9-35C>T (15% versus 13%,  $P = 0.01$ ). Duplicate quality control DNA samples (n = 93 pairs) showed 98% agreement for all assays except for a

96% agreement for ERCC2 D312N. NAT2 and GSTM1 genotypes were determined as previously described (14).

### **Statistical Analysis**

For each individual polymorphism, we estimated odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI) using logistic regression models adjusting for gender, age at interview in 5-year categories, region, and smoking status (never, occasional, former, and current). These unconditional models provided estimates similar to conditional logistic regression models for individually matched pairs (data not shown). A global test for the association between genetic variation in NER pathway as a whole was performed based on the maximum of trend statistics of all the individual polymorphisms. The  $P_s$  for the global test was computed by the permutation method (17).

Gene-gene and gene-smoking interactions were assessed using pairwise comparisons in logistic regression models, as well as classification trees (CART) implemented in the S-Plus "tree" function. CART is an exploratory technique that uses splitting rules to stratify data into groups with homogenous risk (18). Its advantage over logistic regression is the ability to identify subgroups of individuals defined by environmental and/or genetic characteristics that are at high risk, suggesting the presence of gene-gene or gene-environment interactions. Indicator variables for smoking status (ever versus never) and genotypes (homozygous wild-type versus heterozygous or homozygous variants) were included in the CART models. Ten-fold cross-validation was used to reduce overfitted trees to their optimal size. Indicator variables for terminal nodes in the final tree were used in logistic regression models to estimate ORs and 95% CIs.

Unless otherwise specified, statistical analyses were done with STATA version 8.2, Special Edition (STATA Corp., College Station, TX).

## RESULTS

A description of the seven NER genes and 22 SNPs evaluated in this study, including minor allele frequencies in the control population, is shown in Table 1. Frequencies were similar to those previously reported in Caucasian populations (3). Exploration of associations for each individual SNP with bladder cancer risk revealed significant associations with SNPs in four of seven NER genes (Supplementary Table S1).

**Table 1. Genes and SNPs in NER evaluated in the Spanish Bladder Cancer Study**

Gene symbol	Gene name	Chromosomal location	Nucleotide change	Amino acid change	dbSNP ID	Minor allele frequency in the control population
XPC	Xeroderma pigmentosum, complementation group C	3p25	Ex9–398A>G	R493R	rs2227999	0.07
			Ex9–377C>T	A500V	rs2228000	0.26
RAD23B	RAD23 homologue B	9q31.2	Ex16+211A>C	K939Q	rs2228001	0.40
			IVS5–66A>G		rs1805332	0.26
			IVS5–57A>T		rs1805331	0.16
			IVS5–15A>G		rs1805335	0.42
			Ex7+65C>T	A249V	rs1805329	0.15
ERCC6	Excision repair cross-complementary group 6, formerly known as CBS	10q11.23	Ex18–90G>C	R1230P	rs4253211	0.08
ERCC2	Excision repair cross-complementary group 2, formerly known as XPD	19q13.3	Ex6–10A>C	R156R	rs238406	0.47
ERCC1	Excision repair cross-complementary group 1	19q13.2-q13.3	Ex10–16G>A	D312N	rs1799793	0.31
			IVS19–70C>T		rs1799787	0.27
			Ex23+61A>C	K751Q	rs13181	0.33
			IVS5+33A>C		rs3212961	0.12
ERCC4	Excision repair cross-complementary group 4, formerly known as XPF	16p13.3-p13.11	196bp 3' of STP G>T	Q504K	rs3212986	0.25
			Ex8+31G>A	R415Q	rs1800067	0.11
ERCC5	Excision repair cross-complementary group 5, formerly known as XPG	13q22;13q33	IVS9–35C>T		rs1799799	0.36
			Ex10–34T>C	S662P	rs2020955	0.01
			Ex11–247T>C	S835S	rs1799801	0.31
			Ex2+50T>C	H46H	rs1047768	0.43
			Ex7+88A>G	M254V	rs1047769	0.03
Ex8–369G>C	C529S	rs2227869	0.04			
			Ex15–344G>C	D1104H	rs17655	0.27

Table 2 shows ORs (95% CI) for selected SNPs with significant or borderline significant associations in the current study, or SNPs evaluated in relation to bladder cancer risk in previous reports. Compared with homozygous wild-type individuals, those carrying genotypes with variant alleles for RAD23B IVS5-15A>G (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.5;  $P = 0.01$ ), ERCC2 R156R (OR, 1.3; 95% CI, 1.1-1.6;  $P = 0.006$ ), ERCC1 IVS5+33A>C (OR, 1.2; 95% CI, 1.0-1.5,  $P_{trend} = 0.04$ ), and ERCC5 M254V (OR, 1.4; 95% CI, 1.0-2.0;  $P = 0.04$ ) had a significant increase in risk. None of the SNPs evaluated in XPC, ERCC6, or ERCC4 were significantly related to risk (Supplementary Table S1). A global test for pathway effects as determined by the 22 NER polymorphisms indicated that variation in this pathway significantly predicts bladder cancer risk ( $P = 0.04$ ).

**Table 2. Association between selected polymorphisms in NER genes and bladder cancer risk, adjusted for gender, age, region, and smoking status (1,150 cases and 1,149 controls; see Supplementary Table S1 for a full report of all SNPs evaluated)**

Gene	SNP	Genotype	Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI)	P
XPC	K939Q	AA	374 (33)	411 (36)	1.0	
		AC	575 (51)	536 (47)	1.2 (1.0-1.4)	0.07
		CC	188 (17)	191 (17)	1.1 (0.8-1.4)	0.61
		AC or CC			1.2 (1.0-1.4)	$P_{\text{trend}} = 0.35$
RAD23B	IVS5-15A>G	GG	337 (30)	390 (35)	1.0	
		AG	571 (51)	524 (47)	1.3 (1.1-1.6)	0.01
		AA	216 (19)	205 (18)	1.2 (0.9-1.6)	0.12
				AG or AA		
ERCC2	R156R	AA	268 (24)	327 (29)	1.0	
		AC	578 (51)	528 (47)	1.3 (1.1-1.6)	0.01
		CC	287 (25)	270 (24)	1.3 (1.0-1.7)	0.04
		AC or CC			1.3 (1.1-1.6)	$P_{\text{trend}} = 0.03$
	D312N	GG	517 (46)	538 (48)	1.0	
		AG	474 (42)	467 (42)	1.1 (0.9-1.3)	0.55
		AA	138 (12)	117 (10)	1.2 (0.9-1.6)	0.16
				AG or AA		
	K751Q	AA	490 (43)	512 (46)	1.0	
		AC	500 (44)	487 (43)	1.1 (0.9-1.3)	0.45
		CC	146 (13)	126 (11)	1.2 (0.9-1.6)	0.22
				AC or CC		
ERCC1	IVS5+33A>C	CC	851 (75)	885 (78)	1.0	
		AC	255 (23)	225 (20)	1.2 (1.0-1.5)	0.11
		AA	24 (2)	18 (2)	1.6 (0.8-3.0)	0.19
				AC or AA		
ERCC5	H46H	CC	385 (35)	366 (33)	1.0	
		CT	530 (48)	506 (46)	1.0 (0.8-1.2)	0.99
		TT	188 (17)	222 (20)	0.8 (0.6-1.0)	0.06
				CT or TT		
	M254V	AA	979 (91)	995 (93)	1.0	
		AG	93 (9)	72 (7)	1.4 (1.0-1.9)	0.08
		GG	5 (0)	1 (0)	—	
				AG or GG		
	D1104H	GG	629 (55)	607 (53)	1.0	
		CG	434 (38)	445 (39)	0.9 (0.8-1.1)	0.55
		CC	78 (7)	84 (7)	0.9 (0.6-1.3)	0.54
				CG or CC		

The observed genotype associations with bladder cancer risk were not substantially modified by gender, age, dietary folic acid intake, and NAT2 or GSTM1 genotypes (data not shown), or consistently found in any particular stratum defined by these variables. Associations for RAD23B IVS5- 15A>G, ERCC1 IVS5+33A>C, and ERCC5 M254V seemed to be stronger for cigarette smokers than for never smokers; however, the number of never smokers was relatively small and differences were not statistically significant (Table 3). In contrast, we found a suggestion for a stronger association between bladder cancer and ERCC2 R156R for never smokers compared with ever smokers (Table 3; P-interaction = 0.04). Genotype relative risks were similar for former and current smokers, and no significant differences were observed for smokers of black or blond tobacco types nor for the effect of smoking intensity (average cigarettes per day) or duration on bladder cancer risk among smokers with and without the putative

“at risk” alleles (data not shown). Evaluation of gene-gene pairwise interactions between the four SNPs associated with bladder cancer risk showed joint effects ranging from 1.4 to 2.6 (Table 4). Joint effects did not significantly depart from a multiplicative model, except for the combination of variant genotypes for RAD23B IVS5-15A>G and ERCC2 R156R (joint OR, 1.4; 95% CI, 1.0-1.9; P-interaction = 0.04).

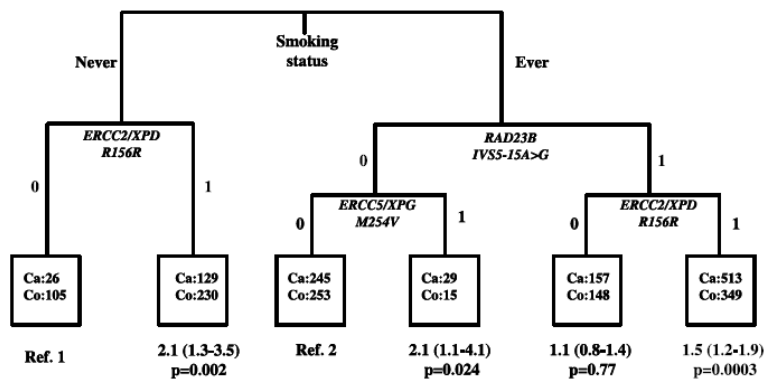
**Table 3. Association between selected polymorphisms in five genes involved in NER and bladder cancer risk for never and ever cigarette smokers, adjusted for age, region, and gender**

Gene	SNP	Smoking status	Homozygous wild type		Heterozygous/homozygous variant		OR (95% CI)	P	P <sub>interaction</sub>
			Cases	Controls	Cases	Controls			
XPC	K939Q	Never	131	279	24	47	1.1 (0.6-1.8)	0.84	0.82
		Ever	825	696	131	96	1.1 (0.9-1.5)	0.38	
RAD23B	IVS5-15A>G	Never	48	109	107	221	1.1 (0.7-1.7)	0.64	0.55
		Ever	289	281	680	508	1.3 (1.0-1.6)	0.02	
ERCC2	R156R	Never	26	105	129	230	2.2 (1.3-3.5)	0.002	0.04
		Ever	242	222	736	568	1.2 (1.0-1.5)	0.05	
	D312N	Never	67	160	89	169	1.2 (0.8-1.8)	0.34	0.61
		Ever	450	378	523	415	1.1 (0.9-1.3)	0.42	
K751Q	Never	66	158	93	173	1.3 (0.9-1.9)	0.19	0.40	
	Ever	424	354	553	440	1.1 (0.9-1.3)	0.45		
ERCC1	IVS5+33A>C	Never	126	259	33	72	0.9 (0.6-1.5)	0.78	0.27
		Ever	725	626	246	171	1.3 (1.0-1.6)	0.04	
ERCC5	H46H	Never	49	101	103	217	1.0 (0.6-1.5)	0.86	1.00
		Ever	336	265	615	511	1.0 (0.8-1.2)	0.70	
	M254V	Never	139	287	11	22	1.1 (0.5-2.3)	0.85	0.47
		Ever	840	708	87	51	1.5 (1.0-2.1)	0.03	
D1104H	Never	78	172	79	163	1.0 (0.7-1.5)	0.95	0.76	
	Ever	551	435	433	366	0.9 (0.8-1.1)	0.57		

Figure 1 shows the final CART model for smoking status and NER genotypes. Ten-fold cross-validation indicated an optimal tree with six terminal nodes. The number of cases and controls are shown for each terminal node. Not surprisingly, the first split was for smoking status. Ever smokers were further split according to combinations of three genotypes, suggesting a possible three-way interaction between RAD23B IVS5-15A>G, ERCC5 M254V, and ERCC2 R156R. On the other hand, only ERCC2 R156R seemed to be important in determining risk among never smokers. This CART model suggested the presence of subgroups of individuals defined by smoking and NER genotypes that could have substantial increases in risk.

**Table 4.** Pairwise joint associations for four NER genes (*RAD23B IVS5-15A>G*, *ERCC2 R156R*, *ERCC1 IVS5+33A>C*, *ERCC5 M254V*) and bladder cancer risk, adjusted for gender, age, and smoking status

Genotype 1	Genotype 2	Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI)	P	P <sub>interaction</sub>
<i>RAD23B IVS5-15A&gt;G</i>	<i>ERCC2 R156R</i>					
GG	AA	90 (8)	110 (10)	1.0 (reference)		
GA or AA	AA	175 (16)	211 (19)	0.9 (0.6-1.3)	0.60	
GG	AC or CC	245 (22)	275 (25)	1.0 (0.7-1.4)	0.84	
GA or AA	AC or CC	599 (54)	506 (46)	1.4 (1.0-1.9)	0.06	0.04
<i>RAD23B IVS5-15A&gt;G</i>	<i>ERCC1 IVS5+33A&gt;C</i>					
GG	CC	244 (22)	294 (27)	1.0 (reference)		
GA or AA	CC	589 (53)	573 (52)	1.3 (1.0-1.6)	0.034	
GG	AC or AA	86 (8)	93 (8)	1.1 (0.8-1.6)	0.49	
GA or AA	AC or AA	186 (17)	146 (13)	1.6 (1.2-2.1)	0.002	0.63
<i>RAD23B IVS5-15A&gt;G</i>	<i>ERCC5 M254V</i>					
GG	AA	287 (27)	345 (33)	1.0 (reference)		
GA or AA	AA	676 (64)	633 (60)	1.3 (1.1-1.6)	0.01	
GG	AG or GG	34 (3)	23 (2)	1.9 (1.1-3.4)	0.03	
GA or AA	AG or GG	61 (6)	48 (5)	1.6 (1.0-2.5)	0.03	0.22
<i>ERCC2 R156R</i>	<i>ERCC1 IVS5+33A&gt;C</i>					
AA	CC	232 (21)	280 (25)	1.0 (reference)		
AC or CC	CC	604 (54)	590 (53)	1.2 (1.0-1.5)	0.06	
AA	AC or AA	32 (3)	43 (4)	1.0 (0.6-1.6)	0.881	
AC or CC	AC or AA	246 (22)	197 (18)	1.5 (1.2-2.0)	0.002	0.37
<i>ERCC2 R156R</i>	<i>ERCC5 M254V</i>					
AA	AA	226 (21)	276 (26)	1.0 (reference)		
AC or CC	AA	740 (70)	704 (67)	1.3 (1.0-1.6)	0.03	
AA	AG or GG	30 (3)	33 (3)	1.1 (0.7-1.9)	0.67	
AC or CC	AG or GG	68 (6)	39 (4)	2.2 (1.4-3.4)	0.0007	0.24
<i>ERCC1 IVS5+33A&gt;C</i>	<i>ERCC5 M254V</i>					
CC	AA	722 (68)	768 (73)	1.0 (reference)		
AC or AA	AA	240 (23)	217 (21)	1.2 (1.0-1.5)	0.11	
CC	AG or GG	75 (7)	61 (6)	1.4 (0.9-2.0)	0.11	
AC or AA	AG or GG	23 (2)	10 (1)	2.6 (1.2-5.7)	0.02	0.28



**Figure 1.** Classification tree model for cigarette smoking, NER polymorphisms and bladder cancer risk. *Ca*, cases; *Co*, controls. ORs (95% CIs) and *P*s under terminal nodes are for genotype-bladder cancer associations within smoking categories estimated from a logistic regression model (ref. 1 is the reference group among never smokers and ref. 2 is the reference group among ever smokers). Codes for genotypes are 0 for homozygous wild type and 1 for heterozygous or homozygous variants.

## DISCUSSION

In this report, we showed that genetic variation in the NER pathway, which is responsible for protecting against DNA damage from chemical carcinogens in tobacco smoke (2), significantly contributes to bladder cancer risk (global test  $P = 0.04$ ). Of the 22 SNPs in seven NER genes evaluated, four were significantly related to a small

increase in bladder cancer risk (RAD23B IVS5-15A>G, ERCC2 R156R, ERCC1 IVS5+33A>C, and ERCC5 M254V).

Previous epidemiologic studies have evaluated a limited number of variants in NER genes in relation to bladder cancer risk (refs. 8-13; Table 5). The XPC gene codes for a protein involved in the recognition of the DNA damage to be repaired by NER (2). The homozygous variant genotype for XPC K939Q significantly increased risk of bladder cancer in a previous study in Sweden (8) but not in a study in the United Kingdom (9) or in the current study population in Spain; however, a small increase in risk for homozygous variants cannot be excluded. Additional epidemiologic evidence and a better understanding of the functional significance of this amino acid change (5) would be needed to establish or rule out a potential small effect. This variant is in strong linkage disequilibrium with two other variants that could affect the function of the gene: XPC polyAT (XPC-PAT) has been linked to reduced repair capacity (19), and XPC IVS11-6 alters protein function (20). However, none of these variants were associated with elevated bladder cancer risk in a study of 547 cases in the United Kingdom (9).

The protein coded by RAD23B forms a complex with XPC during damage recognition (2). In the current study, a variant in intron 5 of RAD23B (IVS5-15A>G) was associated with a significant increased risk. This variant has not been previously evaluated in relation to bladder cancer risk, and its functional significance is unknown.

The ERCC2 gene encodes a DNA helicase subunit of the core transcription factor IIIH that is essential for NER and transcription (2). A nonsynonymous variant (K751Q) in ERCC2 that has been linked to deficiencies in NER repair in some functional studies (4-6) was not associated with a significant increase in bladder cancer risk in the current Spanish population, or in five previous studies conducted in the United States, Sweden, and Italy (refs. 8, 10-13; Table 5). The ERCC2 D312N polymorphism was also not associated with an overall increase in bladder cancer risk in our population nor in a previous study of 505 cases in the United States (ref. 10; Table 5).



**Table 5. Summary of previous studies on associations between polymorphisms in selected NER genes and bladder cancer risk**

Gene	SNP	First author	Year	Country	Cases	Controls	Minor allele frequency (controls)	Heterozygous vs homozygous wild type, OR (95% CI)	Homozygous variants vs homozygous wild type, OR (95% CI)
XPC	K939Q	Sanyal S.	2003	Sweden	327	327	0.34	1.1 (0.8-1.6)	2.0 (1.1-3.6)
		Sak S.C.	2005	United Kingdom	547	579	0.40	0.8 (0.6-1.0)	1.0 (0.7-1.4)
	PolyAT	Current study		Spain	1,150	1,149	0.40	1.2 (1.0-1.4)	1.1 (0.8-1.4)
		Sak S.C.	2005	United Kingdom	547	579	0.40	0.8 (0.6-1.0)	1.0 (0.7-1.4)
ERCC2	K751Q	Sak S.C.	2005	United Kingdom	547	579	0.40	0.8 (0.6-1.0)	1.0 (0.7-1.4)
		Matullo G.*	2001	Italy	124	85	0.42	0.8 (0.4-1.6)	1.1 (0.4-2.9)
ERCC2	K751Q	Shen M.	2003	Italy	201	214	0.40	0.9 (0.6-1.4)	1.0 (0.6-1.8)
		Stern, M.C.	2002	United States	228	210	0.38	1.0 (0.7-1.5)	0.8 (0.4-1.3)
		Sanyal S.	2003	Sweden	327	327	0.38	1.1 (0.7-1.6)	1.3 (0.8-2.2)
	D312N	Schabath M.	2005	United States	505	486	0.34	1.0 (0.8-1.4)	1.2 (0.9-1.4)
		Current study		Spain	1,150	1,149	0.33	1.1 (0.9-1.3)	1.2 (0.9-1.6)
		Schabath M.	2005	United States	505	486	0.29	1.1 (0.8-1.4)	1.1 (0.9-1.4)
ERCC5	D1104H	Current study		Spain	1,150	1,149	0.31	1.1 (0.9-1.3)	1.2 (0.9-1.6)
		Sanyal S.	2003	Sweden	327	327	0.23	1.1 (0.8-1.6)	0.4 (0.2-0.9)
		Current study		Spain	1,150	1,149	0.27	0.9 (0.8-1.1)	0.9 (0.6-1.3)

\*OR (95% CI) were calculated from published data.

The proteins coded by ERCC4 and ERCC1 form a heterodimeric protein with endonuclease activity that cuts the DNA strand at the 5' side of the damage (2). The ERCC5 gene codes for an endonuclease that cuts the DNA strand at the 3' side of the damage. Our data suggested an increased risk of bladder cancer associated with variant alleles in ERCC1 IVS5+33A>C and ERCC5 M254V. These associations have not been previously reported and the functional significance of the variants is unknown. Thus, they need to be confirmed in future studies. Our data were consistent with a small reduction in risk associated with the variant allele for ERCC5 D1104H, as previously indicated in a bladder cancer study in Sweden (8) and a study of lung cancer (21). However, this protection was not significant in our study population.

Evaluation of pairwise joint associations between putative susceptibility variants suggested that individuals carrying two variants might have substantial increases in risk. CART, a technique to explore high-order interactions (18), suggested the presence of subgroups of individuals defined by smoking and NER genotypes that could have substantial increases in risk. We did internal cross-validation to determine the optimal tree model. However, exploratory techniques are prone to overfitting the data, and the ORs for specific genotype combinations indicated by these models need to be interpreted with caution. External validation in independent data is needed to confirm these findings.

The strengths of our study population include high participation rates and large sample size. Our study had adequate statistical power to detect relatively small genotype associations; however, the power to detect interactions was limited. Rather than carrying out a detailed characterization of the genetic variation in any particular NER gene, we selected a few SNPs in key NER genes to attempt to capture common variation in this pathway as a whole. Common variation in individual genes in a complex pathway involving multiple genes, such as NER, is unlikely to have strong associations with cancer risk. This is especially true for genetic markers of unknown functional significance that are used as potential surrogates for “causative” variants. When multiple genes in one pathway have weak associations with risk, a global test for pathway effects, such as the one used in this report, can be more powerful than individual tests to detect an association (22). In addition, because all SNPs are considered simultaneously, a global test also addresses the problem of multiple comparisons. Because we did not include a dense survey of SNPs in genes of interest intended to capture haplotype diversity, it is possible that additional genetic variants are related to bladder cancer risk. Three genotypes that were not significantly associated with bladder cancer risk showed small but significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium in the control population (i.e., RAD23B IVS5-57, ERCC4 R415Q, and ERCC4 IVS9-35C>T). Duplicate quality control samples showed ≥98% genotype agreement for all three assays, indicating that departures were unlikely to be due to genotyping error. Furthermore, a sensitivity analysis where ORs and 95% CIs were reestimated using the expected genotype frequencies under Hardy-Weinberg equilibrium in the control population showed no substantial changes in estimated OR's.

In conclusion, our results provide support for an overall association between genetic variation in the NER pathway and bladder cancer risk and suggest the presence of gene-gene and gene-smoking interactions. However, it is unclear what the causative variants are, and a more detailed characterization of the genetic variation in key NER genes is warranted. Pooling comparable data from current and ongoing studies will be required to confirm small associations and to evaluate complex interrelationships between genetic variants and cigarette smoking suggested by this report. These efforts

might ultimately help identify multiple susceptibility variants that jointly could be responsible for substantial increases in bladder cancer risk.

### **Participating Study Centers in Spain**

Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona: Coordinating Center (M. Kogevinas, N. Malats, F.X. Real, M. Sala, G. Castaño, M. Torà, D. Puente, C. Villanueva, C. Murta, J. Fortuny, E. López, S. Hernández, R. Jaramillo); Hospital del Mar, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona (J. Lloreta, S. Serrano, L. Ferrer, A. Gelabert, J. Carles, O. Bielsa, K. Villadiego); Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona (L. Cecchini, J.M. Saladié, L. Ibarz); Hospital de Sant Boi, Sant Boi, Barcelona (M. Céspedes); Centre Hospitalari Parc Taulí, Sabadell, Barcelona (C. Serra, D. García, J. Pujadas, R. Hernando, A. Cabezuelo, C. Abad, A. Prera, J. Prat); ALTHAIA, Manresa, Barcelona (M. Domènech, J. Badal, J. Malet); Hospital Universitario, La Laguna, Tenerife (R. García-Closas, J. Rodríguez de Vera, A.I. Martín); Hospital La Candelaria, Santa Cruz, Tenerife (J. Taño, F. Cáceres); Hospital General Universitario de Elche, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante (A. Carrato, F. García-López, M. Ull, A. Teruel, E. Andrada, A. Bustos, A. Castillejo, J.L. Soto); Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias (A. Tardón); Hospital San Agustín, Avilés, Asturias (J.L. Guate, J.M. Lanzas, J. Velasco); Hospital Central Covadonga, Oviedo, Asturias (J.M. Fernández, J.J. Rodríguez, A. Herrero); Hospital Central General, Oviedo, Asturias (R. Abascal, C. Manzano); Hospital de Cabueñes, Gijón, Asturias (M. Rivas, M. Arguelles); Hospital de Jove, Gijón, Asturias (M. Díaz, J. Sánchez, O. González); Hospital de Cruz Roja, Gijón, Asturias (A. Mateos, V. Frade); Hospital Alvarez-Buylla, Mieres, Asturias (P. Muntañola, C. Pravia); Hospital Jarrío, Coaña, Asturias (A.M. Huescar, F. Huergo); Hospital Carmen y Severo Ochoa, Cangas, Asturias (J. Mosquera).

### **Acknowledgments**

We thank Robert C. Saal (Westat, Rockville, MD) and Leslie Carroll and Jane Wang (IMS, Silver Spring, MD) for their support in study and data management, Dr. Zeynep Kalaylioglu (IMS) for her support in data analysis, Dr. Maria Sala (Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain) for her work in data collection, Francisco

Fernandez for his work on data management, Dr. Montserrat Torà for her work in the coordination of sample collection and blood processing, and physicians, nurses, interviewers, and study participants for their efforts during field work.

## REFERENCES

1. Hoeijmakers JH. Human nucleotide excision repair syndromes: molecular clues to unexpected intricacies. *Eur J Cancer* 1994;30A:1912 – 21.
2. Friedberg EC. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1:22 – 33.
3. Neumann AS, Sturgis EM, Wei Q. Nucleotide excision repair as a marker for susceptibility to tobacco-related cancers: a review of molecular epidemiological studies. *Mol Carcinog* 2005;42:65 – 92.
4. Au WW, Navasumrit P, Ruchirawat M. Use of biomarkers to characterize functions of polymorphic DNA repair genotypes. *Int J Hyg Environ Health* 2004;207:301 – 13.
5. Vodicka P, Kumar R, Stetina R, et al. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 2004;25:757 – 63.
6. Pavanello S, Pulliero A, Siwinska E, Mielzynska D, Clonfero E. Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis* 2005;26:169 – 75.
7. Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1513 – 30.
8. Sanyal S, Festa F, Sakano S, et al. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis* 2004;25:729 – 34.
9. Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, Kiltie AE. The polyAT, intronic IVS11 – 6 and Lys939Gln XPC polymorphisms are not associated with transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2005;92:2262 – 5.
10. Schabath MB, Delcloas GL, Grossman B, et al. Polymorphism in XPD exons 10 and 23 and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:878 – 84.

11. Stern MC, Johnson LR, Bell DA, Taylor JA. XPD codon 751 polymorphism, metabolism genes, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:1004 - 11.
12. Shen M, Hung RJ, Brennan P, et al. Polymorphisms of the DNA repair genes XRCC1, XRCC3, XPD, interaction with environmental exposures, and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:1234 - 40.
13. Matullo G, Guarrera S, Carturan S, et al. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer* 2001;92:562 - 7.
14. Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005;366:649 - 59.
15. Slimani N, Farran A, Torrent M. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): food composition tables-Spain. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer (IARC); 1996.
16. Packer BR, Yeager M, Staats B, et al. SNP500Cancer: a public resource for sequence validation and assay development for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res* 2004;32:D528 - 32.
17. Westfall PH, Young SS. Resampling based multiple testing. New York (NY): John Wiley & Sons, Inc.; 1993.
18. Zhang H, Bonney G. Use of classification trees for association studies. *Genet Epidemiol* 2000;19:323 - 32.
19. Qiao Y, Spitz MR, Shen H, et al. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis* 2002;23:295 - 9.
20. Khan SG, Muniz-Medina V, Shahlavi T, et al. The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3624 - 31.
21. Jeon HS, Kim KM, Park SH, et al. Relationship between XPG codon 1104 polymorphism and risk of primary lung cancer. *Carcinogenesis* 2003;24:1677 - 81.

22. Schaid DJ, McDonnell SK, Hebring SJ, Cunningham JM, Thibodeau SN. Nonparametric tests of association of multiple genes with human disease. *Am J Hum Genet* 2005;76:780 – 93.

Podeu consultar l'article també aquí:

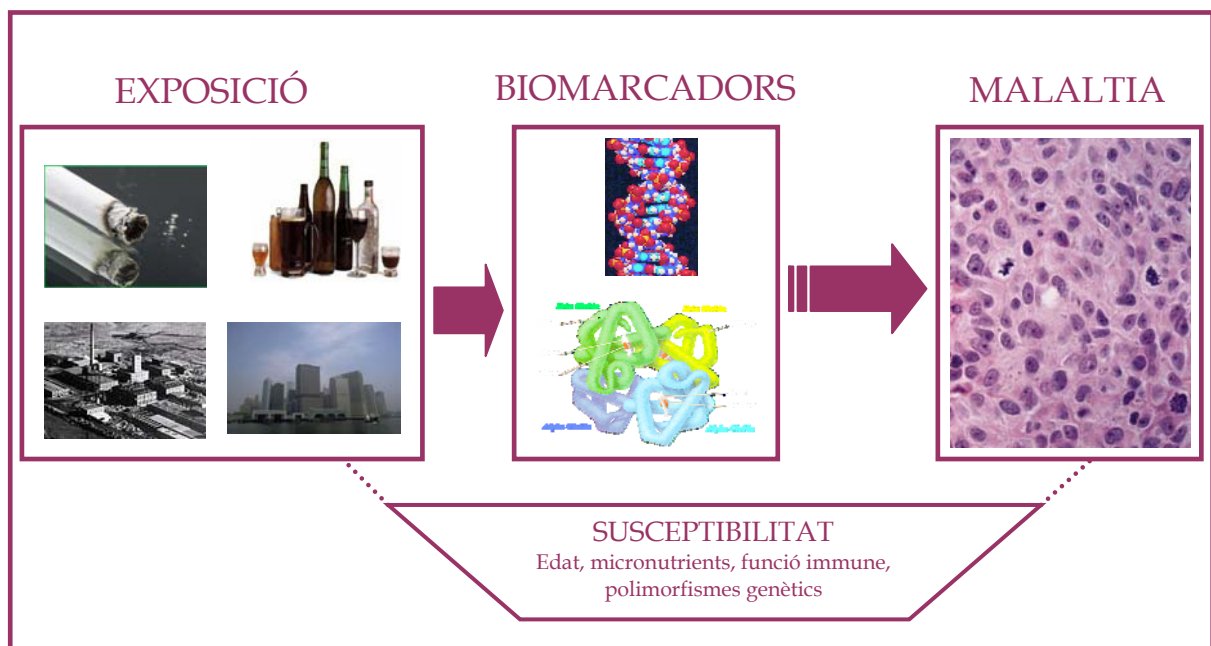
García-Closas M, Malats N, Real FX, Welch R, Kogevinas M, Chatterjee N, Pfeiffer R, Silverman D, Dosemeci M, Tardón A, Serra C, Carrato A, García-Closas R, Lloreta J, Castaño-Vinyals G, Chanock S, Yeager M, Rothman N. [Genetic variation in the nucleotide excision repair pathway and bladder cancer risk](#). *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 2006; 15(3):536-42.



## DISCUSSIÓ

La següent imatge mostra l'esquema que s'ha intentat seguir aquesta tesi doctoral, i que és la base de l'epidemiologia molecular del càncer (Perera, 1996). Comença en l'exposició a diverses substàncies, compostos químics, etc, i finalitza a la malaltia, passant per la mesura d'una sèrie de biomarcadors. Tot el procés, tal i com està assenyalat en la part inferior (figura 6), està modulats per la susceptibilitat, que inclouria tant susceptibilitat genètica (polimorfismes genètics) com altres factors que poden tenir influència, com és l'edat, la ingesta de micronutrients, o la funció immune entre d'altres. En aquesta tesi s'ha aconseguit avaluar, en part, aquest esquema. L'aplicació dels mètodes de l'epidemiologia molecular es complicada i moltes de les tècniques prometedores en el passat tenen seriosos problemes en la seva aplicació en estudis grans poblacionals (Vineis and Perera, 2007).

Figura 6. Esquema de l'epidemiologia molecular del càncer (adaptat de Malats N & Castaño-Vinyals G, 2007)





Hi ha un gran debat sobre el paper del medi ambient en l'etiologia del càncer (Bernard et al., 2007) que fins i tot va arribar a la premsa no científica, com un article al diari New York Time sota el títol: "Environment and Cancer: The Links Are Elusive" (Medi Ambient i Càncer: Els Lligams Són Elusius") (Kolata, 2005). En aquest article s'expressen els punts de vista de diferents científics sobre la qüestió, alguns a favor de la importància de les exposicions ambientals, altres en contra, i dels problemes que cal afrontar per a respondre la pregunta. Part de la controvèrsia es pot atribuir a les dificultats per avaluar el càncer d'origen ambiental.

Una de les característiques del càncer és la seva etiologia multi-factorial. Hi ha molts agents químics, físics o biològics que podrien provocar càncer i que es troben en diferents medis. Els riscos associats a la exposició a molts agents ambientals, com per exemple els contaminants atmosfèrics, no són alts, i això dificulta la seva avaluació. A més a més, els contaminants ambientals poden tenir interaccions entre si i amb altres factors ambientals o dietètics. Un dels primers exemples que es van observar al respecte va ser la interacció entre fumar i estar exposat a amiant en el risc de patir càncer de pulmó (Saracci, 1987). Ambdós factors per separat tenen un risc moderat per la malaltia, però conjuntament el risc és molt major que la simple suma de riscos dels factors individuals. Si traslладem aquesta mateixa idea a exposicions ambientals, ens trobem en un escenari complicat perquè disposem de poques mesures de tot el ventall de contaminants a què estem exposats.

S'ha demostrat que la exposició a molts factors ambientals esta associada amb el desenvolupament del càncer. Però encara hi ha moltes preguntes per respondre, i més que les preguntes, el problema recau en com contestar-les, ja que l'epidemiologia ambiental té limitacions importants, particularment quan s'avalua una malaltia complexa com és el càncer.

## 1. EXPOSICIÓ

Les partícules ultrafines han adquirit rellevància en els últims anys dins la investigació epidemiològica i dels efectes sobre la salut. Són partícules molt petites que tenen una

superfície específica molt elevada que permet que s'adsorbeixin o es condensin molts contaminants atmosfèrics tòxics (Oberdorster, 2001). Pel què fa a la seva massa, representen una fracció molt petita de la concentració total de partícules atmosfèriques (Englert, 2004), però el seu nombre no és menyspreable (Sioutas et al., 2005). És per aquest motiu que i degut a què poden arribar al torrent sanguini, i en conseqüència, als diferents òrgans i teixits del cos, que s'ha centrat l'atenció en aquestes partícules.

En la comparació que vam realitzar amb altres ciutats europees, Barcelona queda classificada com una de les ciutats contaminades, juntament amb Roma, en contraposició de ciutats netes com Helsinki, Stockholm i Augsburg. És a dir, hi ha una clara diferència nord-sud d'Europa, on les ciutats del sud presenten nivells de partícules fins a cinc vegades més grans que les del nord. No se sap el motiu exacte d'aquestes diferències, però hi ha varies hipòtesis que caldria corroborar. Entre elles, s'inclou la major densitat de població, les condicions climatològiques, la intensitat de trànsit o la diferència en el tipus de vehicles. Tot i les grans diferències observades en el nombre de partícules, i els patrons diaris i anuals són similars a totes les ciutats estudiades. Les dades obtingudes es van utilitzar posteriorment per a relacionar-les amb el risc de re-admissió hospitalària per malaltia cardíaca (Lanki et al., 2006; von Klot et al., 2005).

Per l'estudi de càncer de bufeta urinària, no es van poder utilitzar dades objectives de nivells de contaminants; la quantitat de dades disponible era escassa i no comprenia un període de temps prou llarg per a utilitzar-lo en l'estudi cas-control.

Una de les qüestions pendents és quina és la composició química d'aquestes partícules. En el cas dels PAHs, es poden trobar tant a la particulada (Miguel et al., 2004) com a fase gasosa de l'aire (Tsapakis and Stephanou, 2005). En general, els compostos amb major pes molecular, els que contenen més anells aromàtics, són els que queden adsorbits a partícules. Considerant només la proporció que està adherida a les partícules, les concentracions de PAHs segueixen un perfil diari molt similar al comptatge de partícules ultrafines i de fums negres, un altre indicador del trànsit (Junker et al., 2000; Rehwagen et al., 2005). I de fet, estudis sobre la identificació de les fonts de PAHs en nuclis urbans confirmen que aquests PAHs provenen bàsicament de

les emissions de vehicles diesel i benzina, segons un estudi realitzat a un gran nucli urbà com és Nova Deli, Índia (Sharma et al., 2007).

Informació a temps real i retrospectiva sobre totes aquestes dades mencionades constitueix una de les fonts d'informació per avaluar l'exposició dels individus a certs factors de risc. Una altra de les fonts són els qüestionaris. I aquest va ser el principal mètode utilitzat a l'estudi de càncer de bufeta urinària per a relacionar l'exposició a contaminació atmosfèrica, degut a la falta de dades objectives sobre els nivells de contaminació atmosfèrica.

La història residencial recollida per a cada individu durant l'entrevista personal recull informació de l'exposició a contaminació atmosfèrica des del naixement permet tenir una gran diversitat d'exposicions. Es recull aquesta informació a través d'indicadors, tal i com la presència de finestres encarades a un carrer transitat, el nombre de carrils o la intensitat de camions i autobusos, que van mostrar una associació dèbil en relació amb el càncer de bufeta urinària. Viure a menys d'un quilòmetre d'una indústria suposa una exposició als fums que emeten aquelles fàbriques. Aquest indicador mostra una relació moderada amb el càncer de bufeta, i una mica més elevada, tot i que en cap cas arriba a la significació estadística, per a emissions específiques de PAHs i gasoil.

Donada la falta de dades de contaminació atmosfèrica per a poder comparar els resultats de l'entrevista, es va utilitzar la mida de la població de residència com a un altre indicador del nivell de contaminació, sota el supòsit que ciutat més grans tindran més trànsit rodat, i, per tant, major nivells de contaminants a l'aire. Aquest darrer indicador va presentar una associació significativa amb el càncer de bufeta, amb una tendència creixent positiva en augmentar el nivell d'exposició.

Tal i com és d'esperar, la força de l'associació de la contaminació atmosfèrica i el càncer de bufeta és molt menor que en el cas d'exposicions ocupacionals, tal i com també s'ha descrit en el cas del càncer de pulmó.

## 2. BIOMARCADORS

La utilització de biomarcadors en general i la seva introducció a l'epidemiologia va suposar una millora en l'avaluació de l'exposició i del procés evolutiu en la història natural del càncer i altres malalties. L'objectiu dels estudis d'epidemiologia molecular es poder predir un futur càncer abans de la presentació de símptomes clínics. Una de les pioneres en mesurar l'exposició a carcinògens a nivell molecular aplicat a estudis poblacionals va ser Frederica Perera (Perera et al., 1992); en un estudi dut a terme a Polònia va mesurar 6 biomarcadors de dany genotòxic i va observar una associació entre els biomarcadors i l'exposició ambiental.

En el cas dels aductes voluminosos d'ADN és una mesura que integra la dosi absorbida pel cos d'un individu i que no s'ha detoxificat, que ha arribat a una macromolècula biològica i que no ha estat reparada pels mecanismes de defensa del cos (Rundle, 2006). Una de les principals fonts de molècules que potencialment poden formar aquest tipus d'aductes és el tabac. I en una meta-anàlisi dels estudis publicats sobre aductes i risc de càncer s'observa un excés dels nivells d'aductes en els casos comparat en controls (Veglia et al., 2003). No està clara la relació amb ex-fumadors i no fumadors, amb resultats molt heterogenis en els diferents estudis que avaluen el risc de càncer de pulmó (Peluso et al., 2005; Tang et al., 2001). No existeixen estudis que avaluin el risc de càncer de bufeta específicament per a no fumadors, només es presenten resultats ajustats pel tabac. Al ser aquesta la principal font d'exposició susceptible de formar aductes voluminosos, els resultats publicats fins al moment poden mostrar una associació falsa modulada per els elevats nivells d'exposició degut a fumar les cigarretes. El nostre estudi exclou aquesta font d'exposició, i sembla confirmar que no s'observa una relació entre el nivell d'aductes i el risc de càncer de bufeta en el grup de no fumadors. El nivell d'exposició esperat és baix, tot i que no s'han pogut avaluar les altres fonts d'exposició com la dieta, la contaminació atmosfèrica o l'exposició a la feina.

### 3. MALALTIA

El càncer de bufeta urinària a Espanya és el que presenta una major incidència de tots els països de la unió europea en homes (Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer, 2005). La seva prevalença també és molt elevada. Tenint en compte ambdós factors, és una malaltia preocupant des del punt de vista de la salut pública. Els principals factors de risc coneguts no són suficients per a explicar aquesta incidència tan alta. Hem confirmat que el tabac és el principal factor de risc (Samanic et al., 2006), i un dels objectius d'aquest estudi era trobar nous factors de risc, com per exemple l'exposició a subproductes de la cloració (Villanueva et al., 2007) o la contaminació atmosfèrica (Castano-Vinyals et al., 2007).

### 4. SUSCEPTIBILITAT

La susceptibilitat genètica pot modular el risc de càncer de bufeta urinària, ja sigui per polimorfimes en gens codificadors d'enzims implicats en el metabolisme de carcinògens o en gens implicats en la reparació de dany a l'ADN. Segons l'estudi global de 22 polimorfimes de la via de reparació de l'ADN per excisió de nucleòtids, aquests poden predir el risc de càncer de bufeta. Els riscos observats són petits, tal i com s'observa en altres estudis que han analitzat alguns dels polimorfimes, però cal notar que s'ha fet un estudi de tota la via en conjunt, en contraposició amb altres estudis que han avaluat només polimorfimes en alguns gens de tota la via. De totes maneres, però, aquests riscos augmenten en subgrups específics, bàsicament definits per l'hàbit tabàquic. El poder estadístic en el grup d'individus que mai han fumat només permet fer una classificació amb un dels polimorfimes estudiats, però seria interessant poder estudiar més aquest subgrup en relació també amb el nivell d'aductes d'ADN.

## 5. LIMITACIONS DEL TREBALL

Una de les qüestions més importants per a afirmar que existeix una associació causal entre un factor ambiental i un efecte per la salut és la falta de dades d'exposició (Rushton, 2003). Aquesta ha estat la limitació principal per a fer una correcta avaluació de l'exposició.

En estudis epidemiològics sobre càncer, els qüestionaris són una de les fonts de dades d'exposició una de les més importants. La informació és recollida per a tots els individus que participen a l'estudi d'igual manera per tal d'obtenir de les variables d'exposició d'interès. L'estudi de càncer de bufeta recull informació des del naixement, i l'edat mitjana dels casos i controls és de 65 anys. Això fa que no estiguem exempts per complet d'un biaix de record, degut a informació recollida de manera imprecisa pel què fa referència a exposicions del passat. Això podria donar resultat a una mala classificació dels individus segons el seu nivell d'exposició a determinats factors de risc, tot i que en el cas d'existir, preveiem que sigui no diferencial, és a dir, no hi ha raó per pensar que els malats de càncer donin respostes esbiaixades i la resta de malalts (controls) no. Per tal de corroborar que les dades proporcionades al qüestionari són vàlides i certes, caldria contrastar la informació amb dades objectives. En el nostre cas, podríem contrastar la pregunta de la intensitat de trànsit al lloc de residència amb la intensitat de trànsit real. Però les aquestes dades no ens van ser facilitades. D'altra banda, però, tal i com (Gunier et al., 2006) (2006) van observar, els individus que havien que vivien en carrer amb una intensitat de trànsit d'alta a moderada tenien uns valors mitjans de densitat de trànsit quasi quatre vegades més grans que aquells individus que havien dit que vivien en carrers amb poca intensitat. Aquest punt dona suport a què la informació provinent de les entrevistes individuals és vàlida.

D'altra banda, l'existència de dades de contaminació atmosfèrica hauria estat una altra font de dades d'exposició. Donat que la malaltia que estem tractant es càncer, l'origen podria haver estat 10 o més anys abans de la presentació dels símptomes, i per tant, caldria disposar dels nivells de contaminació atmosfèrica en el passat. Les xarxes de vigilància de l'aire per a una monitorització contínua es van establir més tard, per tant, no disposem de dades. Encara que disposéssim d'una sèrie llarga de dades de

monitorització de la contaminació atmosfèrica, no es podrien utilitzar directament per un estudi epidemiològic, caldria fer una imputació individual de l'exposició a contaminació relacionada amb el trànsit.

L'avaluació de les emissions de les indústries que es troben prop del lloc de residència dels individus ha estat feta per higienistes industrials, a falta, altra vegada, de dades d'emissió, actuals i retrospectives. Caldria implementar un programa semblant al que té l'Agència de Protecció Ambiental (EPA) dels Estats Units. És una base de dades de domini públic (<http://www.epa.gov/tri/>) que registra les emissions químiques tòxiques d'algunes indústries i activitats de gestió de residus. Si un model semblant s'apliqués a Espanya, es podrien haver obtingut dades d'emissió de contaminants de les indústries.

## 6. LÍNEES DE RECERCA EN EL FUTUR

Un dels punts que cal abordar de manera important de cara el futur és la millora de l'avaluació de l'exposició. Sobre el treball que ja està fet, no és possible millorar l'avaluació de l'exposició respecte a l'estudi cas-control, degut primordialment a la falta de dades objectives d'exposició. En el cas de tenir informació de monitors ambientals de la contaminació atmosfèrica i amb les tècniques actuals de sistemes d'informació geogràfica es podria aconseguir una imputació individual del nivell de contaminació atmosfèrica a què ha estat exposada la gent. Altres factors a tenir en compte serien els nivells de contaminació al lloc de treball i informació detallada del patró d'activitats diari. Amb tota aquesta informació disponible, es podria fer una classificació més acurada respecte a l'exposició a contaminació atmosfèrica o hidrocarburs aromàtics tant per a l'estudi cas-control com per a relacionar-ho amb biomarcadors.

Els resultats mostrats per a aductes d'ADN estan basats en tamanys mostrals petits. Caldria confirmar els resultats en augment la mida de l'estudi. Dins el Consorci

Internacional de Càncer de Bufeta, hi ha la proposta de fer una anàlisi conjunta de tots els estudis que tenen dades d'aductes, d'ADN. D'altra banda i donat que la principal via de reparació del dany causat per aductes aromàtics a les cadenes d'ADN és la via del NER, seria interessant poder avaluar els polimorfismes en els gens implicats en aquesta via per tal de poder identificar subgrups amb major susceptibilitat en relació amb els nivells d'aductes.





## CONCLUSIONS

- √ Les ciutats del sud d'Europa com Barcelona i Roma són les que presenten nivells més alts de partícules ultrafines, partícules amb capacitat de penetrar al corrent sanguini i arribar als òrgans i teixits.
- √ L'associació entre els indicadors de contaminació atmosfèrica i el càncer de bufeta urinària és de baixa a moderada, però la tendència sempre és positiva, especialment si considerem el nombre d'habitants de la ciutat de residència al llarg de la vida.
- √ No s'observen diferències entre casos i controls pel què fa al nivell d'aductes d'ADN, tot i que no s'han tingut en compte tots factors que poden modular aquesta relació, especialment el de la susceptibilitat genètica, degut al petit tamany mostral.
- √ En general, no s'ha observat relació entre els indicadors de contaminació atmosfèrica i el nivell d'aductes.

## IMPLICACIONS I RECOMANACIONS

- √ La implicació a nivell de salut pública és molt important. L'augment de risc observat és baix, però degut a què la prevalença de l'exposició és molt elevada, la proporció de població afectada pot ser elevada.
- √ És necessari que les dades ambientals es facin públiques i estiguin disponibles per a poder utilitzar en la recerca.



## REFERÈNCIES

- Postlabeling Methods for Detection of DNA Adducts. International Agency for Research on Cancer, Lyon 1993.
- Gran Diccionari de la Llengua Catalana. Enciclopèdia Catalana, 1999.
- Exposure assessment in studies on the chronic effects of long-term exposure to air pollution. 2003. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe.
- Abbey DE, Nishino N, McDonnell WF, Burchette RJ, Knutsen SF, Lawrence BW et al . Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; (159): 373-382.
- Altieri A, La Vecchia C, Negri E. Fluid intake and risk of bladder and other cancers. *Eur J Clin Nutr* 2003; (57 Suppl 2): S59-S68.
- Área de Epidemiología Ambiental y Cáncer CNdEIdSCI. La situación del càncer en España. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo.
- Atkinson RW, Anderson HR, Sunyer J, Ayres J, Baccini M, Vonk JM et al . Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: a European Approach. Am J Respir Crit Care Med* 2001; (164): 1860-1866.
- Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, Dickman PW, Steineck G. Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet* 1999; (353): 703-707.
- Batty DP, Wood RD. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 2000; (241): 193-204.
- Bayona JM, Casellas M, Fernandez P, Solanas AM, Albaiges J. Sources and seasonal variability of mutagenic agents in the Barcelona City aerosol. *Chemosphere* 1994; (29): 441-450.
- Bedwani R, Renganathan E, El Kwahsky F, Braga C, Abu Seif HH, Abul AT et al . Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt. *Br J Cancer* 1998; (77): 1186-1189.
- Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect* 2001; (109 Suppl 3): 389-394.

- Bellander T, Berglind N, Gustavsson P, Jonson T, Nyberg F, Pershagen G et al . Using geographic information systems to assess individual historical exposure to air pollution from traffic and house heating in Stockholm. *Environ Health Perspect* 2001; (109): 633-639.
- Bernard D, Boffetta G, Celani A, Falkovich G. Inverse turbulent cascades and conformally invariant curves. *Phys Rev Lett* 2007; (98): 024501.
- Binkova B, Vesely D, Vesela D, Jelinek R, Sram RJ. Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutat Res* 1999; (440): 45-58.
- Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Geographic patterns of bladder cancer in the United States. *J Natl Cancer Inst* 1978; (61): 1017-1023.
- Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997; (8): 444-472.
- Brennan P, Bogillot O, Cordier S, Greiser E, Schill W, Vineis P et al . Cigarette smoking and bladder cancer in men: a pooled analysis of 11 case-control studies. *Int J Cancer* 2000; (86): 289-294.
- Brunekreef B, Forsberg B. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur Respir J* 2005; (26): 309-318.
- Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. *Lancet* 2002; (360): 1233-1242.
- Case RA, Hopsker ME. Tumour of the urinary bladder as an occupational disease in the rubber industry in England and Wales. *Br J Prev Soc Med* 1954a; (8): 39-50.
- Case RA, Hosker ME, McDonald DB, Pearson JT. Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. I. The role of aniline, benzidine, alpha-naphthylamine, and beta-naphthylamine. *Br J Ind Med* 1954b; (11): 75-104.
- Case RA, Pearson JT. Tumours of the urinary bladder in workmen engaged in the manufacture and use of certain dyestuff intermediates in the British chemical industry. II. Further consideration of the role of aniline and of the manufacture of auramine and magenta (fuchsine) as possible causative agents. *Br J Ind Med* 1954c; (11): 213-216.
- Castano-Vinyals G, Cantor KP, Malats N, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C et al . Air pollution and risk of urinary bladder cancer in a case-control study in Spain. *Occup Environ Med* 2007.
- Castelao JE, Yuan JM, Gago-Dominguez M, Yu MC, Ross RK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and bladder cancer prevention. *Br J Cancer* 2000; (82): 1364-1369.

- Crawford FG, Mayer J, Santella RM, Cooper TB, Ottman R, Tsai WY et al . Biomarkers of environmental tobacco smoke in preschool children and their mothers {see comments}. *Journal of the National Cancer Institute* 1994; (86): 1398-1402.
- Creasia DA, Poggenburg JK, Jr., Nettesheim P. Elution of benzo[alpha]pyrene from carbon particles in the respiratory tract of mice. *J Toxicol Environ Health* 1976; (1): 967-975.
- Dockery DW, Pope CA, III, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME et al . An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med* 1993; (329): 1753-1759.
- Englert N. Fine particles and human health--a review of epidemiological studies. *Toxicol Lett* 2004; (149): 235-242.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin D M. *Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. IARC Press, Lyon 2004.
- Fortuny J, Kogevinas M, Garcia-Closas M, Real FX, Tardon A, Garcia-Closas R et al . Use of analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs, genetic predisposition, and bladder cancer risk in Spain. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; (15): 1696-1702.
- Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, Yu MC, Ross RK. Use of permanent hair dyes and bladder-cancer risk. *Int J Cancer* 2001; (91): 575-579.
- Garcia-Closas M, Malats N, Silverman D, Dosemeci M, Kogevinas M, Hein DW et al . NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet* 2005; (366): 649-659.
- Garcia-Closas R, Garcia-Closas M, Kogevinas M, Malats N, Silverman D, Serra C et al . Food, nutrient and heterocyclic amine intake and the risk of bladder cancer. *Eur J Cancer* 2007; (43): 1731-1740.
- Gehring U, Heinrich J, Kramer U, Grote V, Hochadel M, Sugiri D et al . Long-term exposure to ambient air pollution and cardiopulmonary mortality in women. *Epidemiology* 2006; (17): 545-551.
- Georgiadis P, Kyrtopoulos SA. Molecular epidemiological approaches to the study of the genotoxic effects of urban air pollution. *Mutation research* 1999; (428): 91-98.
- Gunier RB, Reynolds P, Hurley SE, Yerabati S, Hertz A, Strickland P et al . Estimating exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a comparison of survey, biological monitoring, and geographic information system-based methods. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; (15): 1376-1381.
- Gupta RC. 32P-postlabelling analysis of bulky aromatic adducts. *IARC Sci Publ* 1993;11-23.

- Gupta RC, Reddy MV, Randerath K. 32P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen--DNA adducts. *Carcinogenesis* 1982; (3): 1081-1092.
- Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, van den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002; (360): 1203-1209.
- Hoek G, Fischer P, Van Den BP, Goldbohm S, Brunekreef B. Estimation of long-term average exposure to outdoor air pollution for a cohort study on mortality. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2001; (11): 459-469.
- International Agency for Research on Cancer. Polynuclear aromatic compounds, Part 1, Chemical, environmental and experimental data. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1983; (32): 1-453.
- International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 2: Carbon Blacks, Mineral Oils (Lubricant Base Oils and Derived Products) and Some Nitroarenes. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1984a.
- International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 3: Industrial Exposures in Aluminium Production, Coal Gasification, Coke Production, and Iron and Steel Founding. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1984b; (34).
- International Agency for Research on Cancer. Polynuclear Aromatic Compounds, Part 4: Bitumens, Coal-Tars and Derived Products, Shale-Oils and Soots. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1985; (35).
- International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1986; (38).
- International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl* 1987; (Suppl. 7): 1-440.
- International Agency for Research on Cancer. Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1989; (46): 321.
- International Agency for Research on Cancer. Occupational Exposures of Hairdressers and Barbers and Personal Use of Hair Colourants; Some Hair Dyes, Cosmetic Colourants, Industrial Dyestuffs and Aromatic Amines. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1993a; (57).
- International Agency for Research on Cancer. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1993b; (56).
- International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 1998; (38).

- International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 2004; (83).
- International Agency for Research on Cancer. Air Pollution, Part 1, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 2007; (92).
- Jongeneelen FJ. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Science of the total environment* 1997; (199): 141-149.
- Junker M, Kasper M, Roosli M, Camenzind M, Kunzli N, Monn C et al . Airborne particle number profiles, particle mass distributions and particle-bound PAH concentrations within the city environment of Basel: an assessment as part of the BRISKA Project. *Atmos Environ* 2000; (34): 3171-3181.
- Kantor AF, Hartge P, Hoover RN, Narayana AS, Sullivan JW, Fraumeni JF, Jr. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol* 1984; (119): 510-515.
- Katsouyanni K. Ambient air pollution and health. *Br Med Bull* 2003; (68): 143-156.
- Katsouyanni K, Pershagen G. Ambient air pollution exposure and cancer. *Cancer Causes Control* 1997; (8): 284-291.
- Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L et al . Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 2005; (66): 4-34.
- Kogevinas M, 't Mannetje A, Cordier S, Ranft U, Gonzalez CA, Vineis P et al . Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control* 2003; (14): 907-914.
- Kogevinas M, Fernandez F, Garcia-Closas M, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C et al . Hair dye use is not associated with risk for bladder cancer: evidence from a case-control study in Spain. *Eur J Cancer* 2006; (42): 1448-1454.
- Kolata G. Environment and Cancer: The Links Are Elusive. *The New York Times* . 2005. New York.
- Lambert PM, Reid DD. Smoking, air pollution, and bronchitis in Britain. *Lancet* 1970; (1): 853-857.
- Lanki T, Pekkanen J, Aalto P, Elosua R, Berglind N, D'Ippoliti D et al . Associations of traffic related air pollutants with hospitalisation for first acute myocardial infarction: the HEAPSS study. *Occup Environ Med* 2006; (63): 844-851.
- Lopez-Abente G, Aragonés N, Ramis R, Hernandez-Barrera V, Perez-Gomez B, Escolar-Pujolar A et al . Municipal distribution of bladder cancer mortality in Spain: possible role of mining and industry. *BMC Public Health* 2006; (6): 17.



- Lopez-Abente G, Gonzalez CA, Errezola M, Escolar A, Izarzugaza I, Nebot M et al . Tobacco smoke inhalation pattern, tobacco type, and bladder cancer in Spain. *Am J Epidemiol* 1991; (134): 830-839.
- Malats N, Castaño-Vinyals G. *Cancer Epidemiology: study designs and data analysis*. *Clin Transl Oncol* 2007; 9(5):290-7.
- Matullo G, Dunning AM, Guarrera S, Baynes C, Polidoro S, Garte S et al . DNA repair polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study. *Carcinogenesis* 2006; (27): 997-1007.
- Michaud DS, Kogevinas M, Cantor KP, Villanueva CM, Garcia-Closas M, Rothman N et al . Total Fluid and Water Consumption and the Joint Effect of Exposure to Disinfection By-Products on Risk of Bladder Cancer. *Environ Health Perspect* 2007; (In press).
- Miguel AH, Eiguren-Fernandez A, Jaques PA, Froines JR, Grant BL, Mayo PR et al . Seasonal variation of the particle size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and of major aerosol species in Claremont, California. *Atmos Environ* 2004; (38): 3241-3251.
- Momas I, Daures JP, Festy B, Bontoux J, Gremy F. Bladder cancer and black tobacco cigarette smoking. Some results from a French case-control study. *Eur J Epidemiol* 1994; (10): 599-604.
- Mostofi F K, Davis C J, Sesterhenn I. *Histological typing of urinary bladder tumours*. Springer-Verlag, Berlin 1999.
- Mumford JL, Lee X, Lewtas J, Young TL, Santella RM. DNA adducts as biomarkers for assessing exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in tissues from Xuan Wei women with high exposure to coal combustion emissions and high lung cancer mortality. *Environmental health perspectives* 1993; (99): 83-87.
- Mumtaz MM, George JD, Gold KW, Cibulas W, Derosa CT. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol Ind Health* 1996; (12): 742-971.
- Mungan NA, Kiemeny LA, van Dijck JA, van der Poel HG, Witjes JA. Gender differences in stage distribution of bladder cancer. *Urology* 2000; (55): 368-371.
- National Toxicology Program DoHaHSU. 11th Report on Carcinogens. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/toc11.html> . 2007.
- Oberdorster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; (74): 1-8.
- Olsen JH, Wallin H, Boice JD, Jr., Rask K, Schulgen G, Fraumeni JF, Jr. Phenobarbital, drug metabolism, and human cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993; (2): 449-452.

- Paatero P, Aalto P, Picciotto S, Bellander T, Castano-Vinyals G, Cattani G et al . Estimating time series of aerosol particle number concentrations in the five HEAPSS cities on the basis of measured air pollution and meteorological variables. *Atmos Environ* 2005; (39): 2261-2273.
- Pedersen-Bjergaard J, Ersboll J, Hansen VL, Sorensen BL, Christoffersen K, Hou-Jensen K et al . Carcinoma of the urinary bladder after treatment with cyclophosphamide for non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1988; (318): 1028-1032.
- Peluso M, Airoidi L, Armelle M, Martone T, Coda R, Malaveille C et al . White blood cell DNA adducts, smoking, and NAT2 and GSTM1 genotypes in bladder cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; (7): 341-346.
- Peluso M, Munnia A, Hoek G, Krzyzanowski M, Veglia F, Airoidi L et al . DNA adducts and lung cancer risk: a prospective study. *Cancer Res* 2005; (65): 8042-8048.
- Pernanen AS, Sillanpaa M, Hillamo R, Quass U, John AC, Branis M et al . Performance of a high-volume cascade impactor in six European urban environments: mass measurement and chemical characterization of size-segregated particulate samples. *Sci Total Environ* 2007; (374): 297-310.
- Perera FP. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J Natl Cancer Inst* 1996; (88): 496-509.
- Perera FP, Hemminki K, Gryzbowska E, Motykiewicz G, Michalska J, Santella RM et al. Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland . *Nature* 1992; (360): 256-258.
- Perera FP, Jedrychowski W, Rauh V, Whyatt RM. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ Health Perspect* 1999; (107 Suppl 3): 451-460.
- Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 1999; (443): 139-147.
- Pommer W, Bronder E, Klimpel A, Helmert U, Greiser E, Molzahn M. Urothelial cancer at different tumour sites: role of smoking and habitual intake of analgesics and laxatives. Results of the Berlin Urothelial Cancer Study. *Nephrol Dial Transplant* 1999; (14): 2892-2897.
- Pope CA, III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K et al . Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; (287): 1132-1141.
- Puente D, Malats N, Cecchini L, Tardon A, Garcia-Closas R, Serra C et al . Gender-related differences in clinical and pathological characteristics and therapy of bladder cancer. *Eur Urol* 2003; (43): 53-62.

- Rehwagen M, Muller A, Massolo L, Herbarth O, Ronco A. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Sci Total Environ* 2005; (348): 199-210.
- Rundle A. Carcinogen-DNA adducts as a biomarker for cancer risk. *Mutat Res* 2006; (600): 23-36.
- Rushton L. How much does the environment contribute to cancer? *Occup Environ Med* 2003; (60): 150-156.
- Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, Kiltie AE. Comprehensive analysis of 22 XPC polymorphisms and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; (15): 2537-2541.
- Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, Kiltie AE. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms and bladder cancer risk. *BMC Genet* 2007; (8): 13.
- Sala M, Cordier S, Chang-Claude J, Donato F, Escolar-Pujolar A, Fernandez F et al . Coffee consumption and bladder cancer in nonsmokers: a pooled analysis of case-control studies in European countries. *Cancer Causes Control* 2000; (11): 925-931.
- Samanic C, Kogevinas M, Dosemeci M, Malats N, Real FX, Garcia-Closas M et al . Smoking and bladder cancer in Spain: effects of tobacco type, timing, environmental tobacco smoke, and gender. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; (15): 1348-1354.
- Saracci R. The interactions of tobacco smoking and other agents in cancer etiology. *Epidemiol Rev* 1987; (9): 175-193.
- Scherer G, Frank S, Riedel K, Meger-Kossien I, Renner T. Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; (9): 373-380.
- Sharma H, Jain VK, Khan ZH. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. *Chemosphere* 2007; (66): 302-310.
- Silverman D, Devesa S S, Moore L E, Rothman N. Bladder Cancer. In: *Cancer Epidemiology and Prevention*. (Ed.Oxford University Press). 2006; 3rd: 1101-1127.
- Silverman DT, Hoover RN, Mason TJ, Swanson GM. Motor exhaust-related occupations and bladder cancer. *Cancer Res* 1986; (46): 2113-2116.
- Sioutas C, Delfino RJ, Singh M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. *Environ Health Perspect* 2005; (113): 947-955.
- Siwinska E, Mielzynska D, Bubak A, Smolik E. The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. *Mutat Res* 1999; (445): 147-153.

- Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Cogliano V. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncol* 2005; (6): 931-932.
- Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S et al . Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 2001; (61): 6708-6712.
- Tremblay C, Armstrong B, Theriault G, Brodeur J. Estimation of risk of developing bladder cancer among workers exposed to coal tar pitch volatiles in the primary aluminum industry. *Am J Ind Med* 1995; (27): 335-348.
- Tsapakis M, Stephanou EG. Occurrence of gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere: study of sources and ambient temperature effect on the gas/particle concentration and distribution. *Environ Pollut* 2005; (133): 147-156.
- Uccelli R, Mastrantonio M, Di Paola M. [Distribution of causes of death in communities with different urbanization levels]. *Epidemiol Prev* 2000; (24): 28-37.
- Veglia F, Matullo G, Vineis P. Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; (12): 157-160.
- Villanueva CM, Cantor KP, Cordier S, Jaakkola JJ, King WD, Lynch CF et al . Disinfection byproducts and bladder cancer: a pooled analysis. *Epidemiology* 2004; (15): 357-367.
- Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardon A et al . Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering, and swimming in pools. *Am J Epidemiol* 2007; (165): 148-156.
- Vineis P, Perera F. DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. *Int J Cancer* 2000; (88): 325-328.
- Vineis P, Perera F. Molecular epidemiology and biomarkers in etiologic cancer research: the new in light of the old. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; (16): 1954-1965.
- Vineis P, Pirastu R. Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* 1997; (8): 346-355.
- von Klot S, Peters A, Aalto P, Bellander T, Berglind N, D'Ippoliti D et al . Ambient air pollution is associated with increased risk of hospital cardiac readmissions of myocardial infarction survivors in five European cities. *Circulation* 2005; (112): 3073-3079.
- Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; (206): 73-93.

Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW. Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease. *Environ Health Perspect* 2000; (108): 1071-1077.

Zeegers MP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. A prospective study on active and environmental tobacco smoking and bladder cancer risk (The Netherlands). *Cancer Causes Control* 2002; (13): 83-90.

Zeegers MP, Kellen E, Buntinx F, van den Brandt PA. The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World J Urol* 2004; (21): 392-401.

## **ANNEXES**

### **ANNEX 1. ENTREVISTA ALS CASOS I CONTROLS. PREGUNTES RELACIONADES AMB CONTAMINACIÓ ATMOSFÈRICA**

NUMERO DE ID	- - -
ENTREVISTADOR	
EDITOR	
CODIFICADOR	
FECHA EN QUE LA ENTREVISTA FUE TERMINADA	
DIA	MES AÑO
HORA EN QUE LA ENT. EMPEZO...(NECESITA 6 CAMPOS) DE TIEMPO PARA EMPEZAR/TERMINAR)..... :	
HORA EN QUE LA ENT. TERMINO :	
TIEMPO TOTAL	
HRS	MINS

## ESTUDIO MULTICÉNTRICO ESPAÑOL SOBRE GENÉTICA, MEDIOAMBIENTE Y SALUD

Versión Española

### INTRODUCCIÓN:

Le agradecemos que acepte participar en este estudio. Durante la entrevista, le preguntaré sobre, los trabajos que ha realizado, su historial médico, y otras preguntas sobre su pasado. Su participación en este estudio es voluntaria y en cualquier momento puede no contestar una pregunta si así lo desea. Su cooperación es muy importante para este estudio de investigación, ya que nos ayudará a conocer más sobre la salud en personas adultas. Introduciré sus respuestas en el ordenador. Me gustaría, también, grabar nuestra entrevista, para poder verificar si lo que escriba es correcto y preciso. Tiene ¿Acepta la utilización de la grabadora? (GRABAR RESPUESTA DEBAJO.) Me gustaría recordarle que la información que usted nos proporcione será absolutamente confidencial. La entrevista durará aproximadamente entre una hora y media a dos horas, pero podremos hacer una pausa si usted se cansa.

GRABACIÓN DE LA ENTREVISTA:

SI (ENTREVISTADO ACEPTA).1  
NO (ENTREVISTADO RECHAZA) 2

REVISADO: ENERO DE 1999

(IMIM VERSIÓN DEL ESTUDIO PRINCIPAL)

INTRODUCCIÓN: A continuación voy a preguntarle por todos los lugares donde usted ha vivido. ¿Ha usted completado la hoja de la historia residencial que le fue entregada con el folleto del estudio? ENTREVISTADOR: SI LA HOJA DE TRABAJO FUE COMPLETADA, SALTARSE LA INSTRUCCION RESTANTE. SI LA HOJA DE TRABAJO NO FUE COMPLETADA, LEER INSTRUCCION COMPLETA. Por favor, dígame cada lugar de residencia donde haya vivido durante al menos **un año o más**, incluyendo el tiempo que pasó en el servicio militar. Me gustaría **empezar por su residencia actual o el último lugar** donde haya vivido durante al menos un año o más, e ir hacía atrás en el tiempo hasta llegar al lugar donde usted nació. Para su residencia actual, me gustaría saber la calle, ciudad y provincia, el estado o país, así como el número de años que vivió allí. Para residencias previas, la dirección de la calle no es necesaria - calle o nombre de la vecindad, será suficiente.

\*D1.

\*D2.

<p>PARA 01 PREGUNTAR: Antes ha dicho que actualmente está viviendo en [A13 CALLE, CIUDAD, PROVINCIA, PAÍS]</p> <p>PARA 02 - n, PREGUNTAR: ¿Cuál es la dirección del lugar de residencia previo a este, en el que vivió durante al menos un año?</p>	<p>¿Durante que años vivió usted allí?</p> <p>PREGUNTE D1 PARA LA PROXIMA RESIDENCIA (PREVIA). CUANDO HAYA OBTENIDO D1 Y D2 PARA TODOS LOS LUGARES DE RESIDENCIA, IR A D4 PARA RESIDENCIA 01.</p>
<p>[MOSTRAR DIRECCION DE A13]</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>CALLE EXACTA</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>CIUDAD PROVINCIA AUTONOMIA PAÍS</p>	<p>AÑOS</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>DESDE HASTA</p> <p>(SI NS, ENTRAR 9998)</p> <p>(SI ACTUALMENTE ESTA VIVIENDO ALLI, ENTRE 9997 PARA "HASTA" AÑO)</p>
<p>02</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>CALLE O EL NOMBRE DE LA VECINDAD</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>CIUDAD PROVINCIA AUTONOMIA PAÍS</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>DESDE HASTA</p> <p>(SI NS, ENTRAR 9998)</p>
<p>03</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>CALLE O EL NOMBRE DE LA VECINDAD</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>CIUDAD PROVINCIA AUTONOMIA PAÍS</p>	<p>_____</p> <p>_____</p> <p>DESDE HASTA</p> <p>(SI NS, ENTRAR 9998)</p>



	*D4.					D5.
	¿Cuál (es/era) la fuente principal de abastecimiento de agua potable donde vive/cuando usted vivía allí? SI MÁS DE UNA FUENTE, INDAGUE A FONDO POR LA FUENTE PRINCIPAL Y REGISTRE.					¿Cuál (es/era) la profundidad del pozo privado?
	AGUAS MUNICIPALES	POZO PRIVADO	BOTELLA	OTRA (ESPECIFICAR)	NS	
	(SALTAR HASTA D6)	(RESPONDER D5)	(SALTAR HASTA D6)	(SALTAR HASTA D6)	(SALTAR HASTA D6)	
*01	1	2	3	4	8	< 10 metros ..... 1 10-19 metros ..... 2 20-49 metros ..... 3 50-99 metros ..... 4 100 metros o más ..... 5 NS ..... 8
	SI OTRA, ESPECIFICAR: _____					
02	1	2	3	4	8	< 10 metros ..... 1 10-19 metros ..... 2 20-49 metros ..... 3 50-99 metros ..... 4 100 metros o más ..... 5 NS ..... 8
	SI OTRA, ESPECIFICAR: _____					
03	1	2	3	4	8	< 10 metros ..... 1 10-19 metros ..... 2 20-49 metros ..... 3 50-99 metros ..... 4 100 metros o más ..... 5 NS ..... 8
	SI OTRA, ESPECIFICAR: _____					
04	1	2	3	4	8	< 10 metros ..... 1 10-19 metros ..... 2 20-49 metros ..... 3 50-99 metros ..... 4 100 metros o más ..... 5 NS ..... 8
	SI OTRA, ESPECIFICAR: _____					

	*D6.	D7.	D8.
	<p>SI EL SUJETO NUNCA FUMO REGULARMENTE (PREGUNTA B2 = SI), SALTAR A LA PREGUNTA D7. DE OTRA MANERA, HAGA LA PREGUNTA D6. (Mientras usted vive o vivía en) esta residencia, ¿cuántas personas en promedio viviendo o trabajando en su casa fuman o fumaban?</p>	<p>¿Está o estaba este lugar de residencia a menos de 1 kilómetro de una o más fábricas o planta industrial que emana o emanaba humos, gases, o cualquier tipo de partículas o radiación mientras usted vive o vivía allí?</p> <p style="text-align: center;">                     SI                      NO                      NS                      (SALTAR                      (SALTAR                      (SALTAR                      HASTA D9)                      HASTA D9)                 </p>	<p>¿Que fabrica o fabricaba esta fábrica o planta industrial ? Es decir, ¿ cuál es o era el producto primario que producían?</p> <p>SI MÁS DE UNA, LISTAR CADA UNA DE ELLAS.</p> <p style="text-align: center;">PRODUCTO(S) PRIMARIO(S)</p>
*0 1	<p>NÚMERO DE PERSONAS.....  __ __  DK..... 98</p>	<p style="text-align: center;">1                      2                      8</p>	<p>1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____ 8. _____</p>
02	<p>NÚMERO DE PERSONAS.....  __ __  DK..... 98</p>	<p style="text-align: center;">1                      2                      8</p>	<p>1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____ 8. _____</p>
03	<p>NÚMERO DE PERSONAS.....  __ __  DK..... 98</p>	<p style="text-align: center;">1                      2                      8</p>	<p>1. _____ 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____ 8. _____</p>

D9.			D11.	
Este lugar de residencia, ¿tiene o tenía ventanas que da o daban a alguna calle o carretera con mucho tráfico dentro de 50 metros?			En promedio, ¿cuántos camiones o autobuses pasan o pasaban por esta calle o carretera en una día típico cualquiera?	
	SI	NO	NS	
		(SALTAR A LA INTRODUCCIÓN D13)	(SALTAR A LA INTRODUCCIÓN D13)	
01	1	2	8	<20/día..... 1 20-49/día ..... 2 ≥50/día..... 3 NS..... 8
02	1	2	8	<20/día..... 1 20-49/día ..... 2 ≥50/día..... 3 NS..... 8
03	1	2	8	<20/día..... 1 20-49/día ..... 2 ≥50/día..... 3 NS..... 8

D12.

<p>¿Cuántos carriles de circulación hay o habían en total en esta calle o carretera (contando ambas direcciones)?</p> <p>VOLVER A D4 PARA LA SIGUIENTE RESIDENCIA.</p>	
01	<p>NÚMERO DE CARRILES .....</p> <p>NS.....</p>
02	<p>NÚMERO DE CARRILES .....</p> <p>NS.....</p>
03	<p>NÚMERO DE CARRILES .....</p> <p>NS.....</p>



## ANNEX 2. ESQUEMA DEL PROCEDIMENT ANALÍTIC DEL RADIOETIQUETATGE AMB FÒSFOR-32

### 1. Extracció d'ADN

Digestió amb Proteinasa K, extracció orgànica  
Re-hidratació/alíquota  
Fluorimetria (mesura acurada de la concentració d'ADN: 2-4 µg per assaig)

### 2. Radio-etiquetatge amb fòsfor-32

Digestió de l'ADN  
Etiquetatge amb ATP-32P  
Incloure controls negatius i positius (BPDE)

### Cromatografia de capa fina

Preparar les plaques amb anel·lació (rentar/carregar/assecar)  
Aplica la mostra en petits volums i assecar  
Fer córrer les cromatografies (rentar/assecar entre pas i pas)

### 4. Identificació autoradiogràfica de l'aducte

Marcar les plaques per orientar-les per a la posterior recuperació dels aductes  
Utilitzar pantalles intensificadores, posar a -80°C durant 48 hores  
Revelat en la cambra fosca, guardar les plaques  
Identificar la localització dels aductes marcant-ho amb un llapis

### 5. Quantificació dels aductes

Raspar els aductes i posar-los en vials d'escintil·lació  
Contar les DPM (desintegracions per minut), corregir per la vida mitja de l'ATP-32P



## ANNEX 3. PROTOCOL DETALLAT DEL RADIO-ETIQUETATGE AMB FÒSFOR 32

This step is done the day before the post labeling

### 1. Hydrolyze the sample

Use 4  $\mu\text{l}$  of your sample per tube (0.5-1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , can go down to 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Use 6  $\mu\text{l}$  of MNSPD cocktail per tube

Use 8 samples/experiment. Each sample is run in duplicate (i.e. 1A and 1B)

MNSPD COCKTAIL (CKT)=Micrococcal endonuclease and Calf Spleen Phosphodiesterase cocktail

	<u>Per tube</u>	<u>per 18 tubes</u> (for 8 duplicate samples =16 samples + 2 extra)	
MNSPD	2ul	36ul	MNSPD is stored at -70
5Xsalts	2ul	36ul	stored in the fridge (2nd shelf door)
milliQ H2O	2ul	36ul	stored at room temperature

Mix the MNSPD ckt and the sample well (vortex + quick spin) and incubate for 3 hrs at 37 °C.

After incubation store at -70 °C until the assay is done (don't store it for more than 72 h).

Also, wash the 20x20 chromatogram plates in distilled water, attaching a wick to remove the yellow color using hairpins.

### **DAY 1**

### 2. Nuclease P1 ckt

	<u>Per tube</u>	<u>Per 18 tubes</u>	
NP1 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1.2ul	21.6ul	store in the freezer
ZnCl <sub>2</sub> 0.3 mM	1.8ul	32.4ul	store in the fridge (top shelf)
NaOAc 0.25 M	3.0ul	54.0ul	Rm temp (lab shelf)



Take out NP1 from freezer. While it's thawing prepare (behind shielding):

- radioactivity racks
- pipette
- forceps
- plastic frame
- pipette tips

When NP1 is thawed, spin it down for 1 sec.

Make the ckt: 1<sup>st</sup> add ZnCl<sub>2</sub>, 2<sup>nd</sup> NaOAc, 3<sup>rd</sup> NP1. Spin it down for 1 sec.

Add 6ul per tube to the 10 ul of hydrolyzed DNA. Mix well, spin it down for 1 sec and incubate at 37°C for 40 min.

FROM THIS POINT ON YOU SHOULD BE WEARING YOUR RING AND BADGE AND PROTECTIVE CLOTHING

While incubating:

- check tank level of D1

### 3. 32P CKT

We have to use 4 ul of the 32P cocktail per tube

	Per tube	Per 18 tubes	
PNK buffer	1.5 µl	27µl	store in the freezer
Bicine 10mM	? must calculate		store in fridge (top shelf)
32P	? must calculate		store in frig in appropriate container
PNK	0.3µl	5.4µl	store in freezer

At 15-20 min before ending incubation of NP1, take out products for labeling: bicine, PNK buffer (put it at 65°C to thaw) and 32P.

How to calculate amount of bicine and 32P? Example:

32P activity: 100% activity (259.14 µCi/µl) on Oct/18/05

Experiment on Nov/10/05. Decay=0.344 (check decay table for 32P).

$$259.14 \mu\text{Ci}/\mu\text{l} \times 0.344 \text{ decay} = 89.144 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$$

We need 50 µCi per sample

$$50 \mu\text{Ci} \cdot \frac{\mu\text{l}}{89.144\mu\text{Ci}} = 0.561 \mu\text{l per sample} \times 18 \text{ samples} = 10.098 \mu\text{l total}$$

mCi used:

$$10.098 \mu\text{l} \times 0.191 \text{ mCi}/\mu\text{l} = 1.298 \text{ mCi used (to distribute in the waste)}$$

The total volume of the cocktail is 72  $\mu\text{l}$  (for 18 samples). How to calculate the amount of bicine?

$$72 \mu\text{l} - (27 \mu\text{l PNK buffer} + 5.4 \mu\text{l PNK} + 10.1 \mu\text{l 32P}) = 29.5 \mu\text{l bicine}$$

Add the PNK buffer and the bicene first and then the 32P. The PNK is added last (take out from freezer just before taking out samples at the end of NP1 incubation).

Add 4  $\mu\text{l}$  of this ckt to each tube.

Mix well (vortex) and spin for  $\sim 1'$  at 1000 rpms.

Incubate at  $37^\circ\text{C}$  for  $40'$ .

#### 4. Apyrase

	Per tube	Per 18 tubes	
Apyrase	2ul	18ul	Store in the freezer

Mix well and spin as above

Incubate for  $40'$  at  $37^\circ\text{C}$

Total volume per tube= 22  $\mu\text{l}$

Total volume used/spotted per tube= 18  $\mu\text{l}$

#### 5. Spotting the sample on the chromatogram

Poly(ethyleneimine) (PEI) cellulose thin layer chromatography (TLC) sheets were from Macherey-Nagel (Postfach, Germany).

Remove the 20x20 chromatogram sheets, cut them into 10x10 plates while they're damp, and let them dry.

Label each plate with the experiment and sample number, i.e. 1A and 1B. Mark a corner 1cm from the edge where you will spot your sample. This is your point of origin.

Spot 18  $\mu\text{l}$  of your sample at the origin. Dry completely with a hair dryer. Attach a long wick using 2 hairpins, one at each side.

You will now drop your chromatogram into the first solvent-D1.

Use large tanks with just enough D1 to cover the bottom. Drop your chromatogram in the solvent with the wick draped over the back of the tank and let it run overnight.

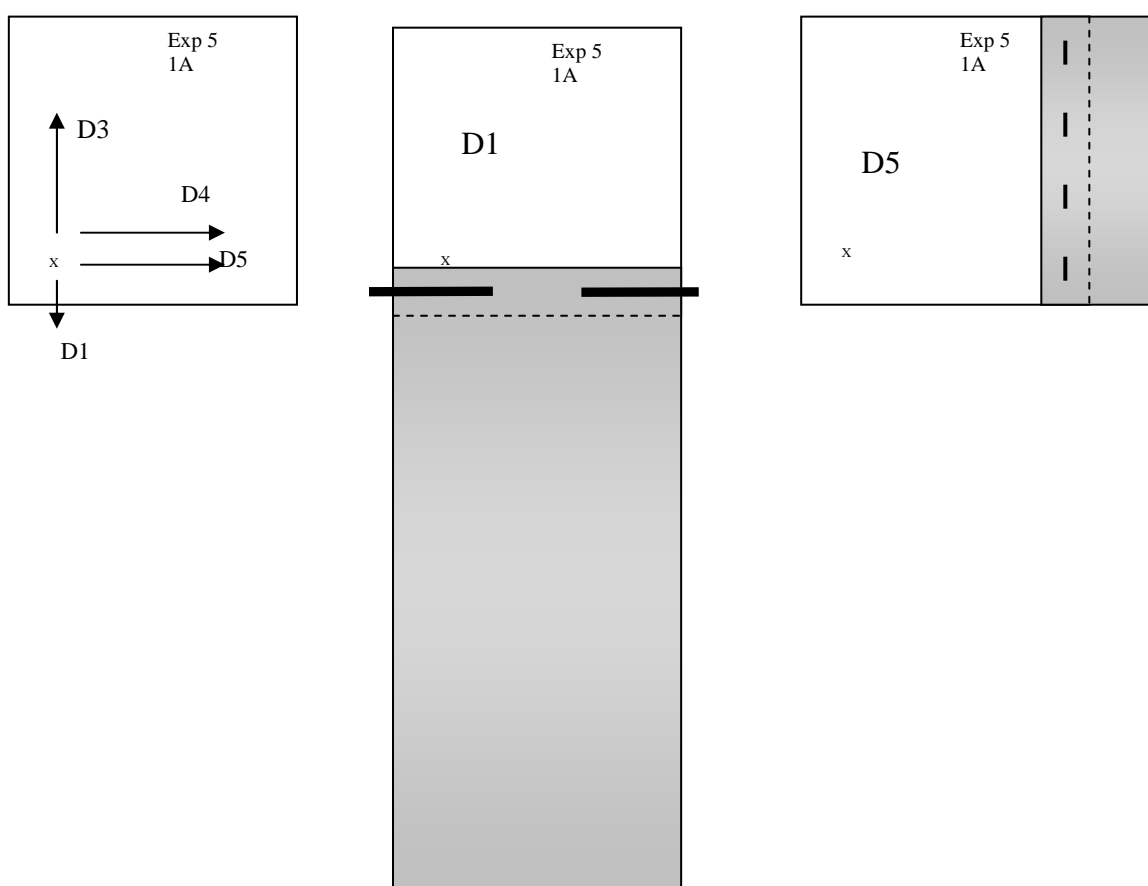
**DAY 2**

Do this step with caution IT IS VERY HOT.

Remove the plates from the D1 solvent behind plexiglas. Take out the hairpins and place the 10X10s in water. Using deionized H<sub>2</sub>O wash these 10X10 very well.

Dry completely the 10X10s and proceed with D3, D4 and D5. Before dropping the plates into each one of the solvents, dip them in a small tank with some deionized water covering the bottom (this will help the chromatography to start).

No wick needed for D3 and D4. Before dropping the plates in D5, attach a small wick using staples. After D5, cut the wick just before the staples.



After chromatography, plates are air dried and placed with film (Blue Basic Autorad 8X10 catalogue # F9024 from ISOBioexpress; 420 North Kays Dr.; Kaysville, Utah 84037) in cassettes and exposed at -80 C for 48 hours. The film was developed and used as a template to excise adducts on each chromatogram and spots were excised from the plates and places into liquid scintillation vials. Five milliliters of 70% ethanol was added and either a Packard Tri-Carb, model 1900 CA or 2200 CA, Liquid Scintillation Analyzer was used to determine radioactivity counts. Each sample was counted for 25 minutes.

Determination of relative adduct labeling (RAL) was performed as described by Talaska et al (1996, Proc Natl Acad Sci).  
All samples were run in duplicate.

**BUTANOL EXTRACTION (instead of Nuclease P1 enhancement method)**

After hydrolysis:

Turn on the refrigerator trap on Savant system (30 minutes before use)

To your 10 ul of hydrolyzed sample, add:

- 5 ul of 10 mM TBA (tetrabutylammonium); lay this over the top of sample  
*fridge door*
- 30 ul of milliQ water
- 5 ul of 0.1 M ammonium formate (pH=3.5) *fridge door*

To this, add:

- 75 ul of butanol saturated with H<sub>2</sub>O (#1) – use the top layer of the liquid
- Vortex during 30 sec. then spin at 14000 rpm for 1 minute
- Remove the top layer to a clean tube. Use the same pipette tip for the duplicate samples and keep the tip for the second extraction of the same sample
- To your original tube, add another 75 ul of Butanol (#1)
- Vortex and spin as above
- Remove the top layer and add to the tube containing the previous sample (discard original tube)

To this sample, add 135 ul of H<sub>2</sub>O saturated butanol (#2) – use the bottom layer of the liquid

Vortex and spin as before

Remove the H<sub>2</sub>O from the bottom and discard

Add another 135 ul of H<sub>2</sub>O sat Butanol (#2) to the tube

Vortex and spin as above

Remove the sample from the top to a clean tube

This is your extracted sample

Dry this sample down using the Savant

When your sample is completely dry, add 10 ul of 10mM bicine (ph=9.8) and mix well

Proceed with post-labelling

Note: we have 10 ul of sample + 4 ul labeling. We need to get to 20 ul of sample at the end of the procedure, so we are sure we're spotting 18 ul in the TLC plate. In the apyrase step, we'll dilute the 2 ul of apyrase with the desired amount of bicine. I.e.: we'll have 14 ul total after labeling. So we need 6 ul more = 2 ul apyrase + 4 ul bicine. For 18 samples, this will be 36 ul apyrase + 72 ul bicine.

## REAGENTS PREPARATION

### **Making up MNSPD**

Micrococcal Nuclease (MN) is obtained from Sigma the cat# is N-3755(200U)  
Spleen Phosphodiesterase (SPD) is obtained from Sigma the cat# is P6897 (25U)

Reconstitute the SPD in ~750ul of fresh milli-Q water  
Put this into a clean microcentrifuge tube (mct).  
Rinse the original vial with another 250ul of the same water  
Put this into the mct.  
Spin the tube for ~1' at top speed  
Carefully remove the supernatant and use it to resuspend the MN  
Transfer this suspension to a clean tube.  
Rinse the MN vial with ~200 ul of water  
Transfer this solution to dialysis tubing  
Dialyze overnight in the cold rm in ~2 L of milli-Q water  
Change this water at the end of the day and again in the morning.  
Divide the MNSPD into mct (~150ul/tube) and freeze at -70  
Test all new batches of MNSPD

### TESTING NEW MNSPD

1. Prepare the MNSPD according to the protocol
2. Hydrolyze the MNSPD

Tube#	1	2	3	4	5	6	7	8
MNSPD	0	1.5	3.	4.5	6.	7.5	9	10.5
WATER	12.	10.5	9.	7.5	6	4.5	3.	1.5
5Xsalts	6.	6.	6.	6.	6.	6.	6.	6.

3. Transfer 6ul of each dilution to a duplicate tube.
4. Add 4ul of 0.25ug/ul of calf thymus DNA to ea tube
5. Incubate this for 3 hours at 37°C
6. On the same or the next day
7. Add 10ul of milliQwater to ea tube and mix well.
8. Transfer 3.4ul of this mixture to duplicate tubes.
9. Make up your 32Ppkt

these amount are per tube

- 1.0ul of cold ATP
- 1.32ul of 10mM bicine
- 1.5ul of PNK buffer
- 0.28ul of PNK
- 2.5ul of 32P this amt is based on 200uCi/sample

10. Add 6.6ul of the 32Pckt to each tube (ones with the 3.2ul in them)
11. Incubate these tubes for 40' at 37°C
12. Add 2ul of Apyrase to each tube
13. Incubate for 40' at 37°C
14. In duplicate tubes pipette 495ul of bicine
15. To each of these tubes add 5ul of your sample
16. Spot 5ul of each sample onto 3-10X20 chromatogram
  - 1 will be run in sodium phosphate
  - 2 will be run in lithum chloride
17. When the plates have run in their solvents – dry and mark (for orientation)
18. Expose the plates to film for ~10', then develop the film
19. Determine the amount of MNSPD to use in your experiments.

### **5x SALTS**

The 5X is 50mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM Sodium Succinate (pH 6.0)

1) Dissolve 0.55597 g of CaCl and 1.189g of Sodium Succinate in 50-75 ml milliQ water. pH to 6.0 using either NaOH or HCL

2) Dillute to 100 with milliQ water

3) Freeze at -20. Can be stored indefinitely

### **NUCLEASE P1** (Sigma N-6830; 5 mg)

Dissolve contents in 5 ml of milliQ water. Aliquot and store in freezer (-20).

### **NaOAc 0.25 M**

Make new every 3 months

**10x PNK BUFFER (pH=10)**

Buffer	Components
10 x Stock=200 mM	Bicine-NaOH pH=10
10 x = 100 mM	Dithiothreitol
10 x = 10 mM	Spermidine
10 x = 100 mM	MgCl <sub>2</sub>

Buffer should be made in 10-20 ml batches and kept in 1.0 ml aliquots in 1.5 ml tubes labeled PNK buffer and kept frozen at -20 C in NMT freezer:

- Bicine (200 mM) Sigma # B-3876 Bench shelf  
MW= 163.2 g/ 200 / 0.010 l= 0.3264 g in 10 ml
- Dithiothreitol (100 mM) Sigma #D-0632 Desiccator #1  
FW=154.3  
154.3mg/mM x 100 mM x 0.01 l=0.1543 g in 10 ml
- Spermidine (10 mM) Sigma #2501 Desiccator #1  
254.6 mg/mM x 10mM x 0.01 l = 0.02546 g in 10 ml
- MgCl<sub>2</sub> (100 mM) Sigma #M-0250  
FW = 203.33mg/mM x 100 mM x 0.01 l = 0.20333 g in 10 ml

Dissolve compounds in 5-7 ml of distilled water pH 9.6 to NaOH and dilute to 10 ml with distilled water.

**Bicine-NaOH pH 10 (100 mM) Sigma # B-3876 Bench shelf**

1. This reagent is used to make up the volume in the labeling cocktail (PNK mix) and as the basis of a 10 mM Bicine-NaOH solution which is used to dilute the normal nucleotides
2. 100 ml batches are made  
163.2 mg/mM x 100 mM x 0.1 l = 1.632 g in 100 ml
3. Dissolve 1.632 g Bicine in about 70-80 ml distilled water pH to 9.6 with NaOH. Then dilute to 100 ml with distilled water; recheck pH.
4. Reserve 10 ml for 100 mM Bicine. Use the 90 ml to make 900 ml of 10 mM Bicine

**Bicine-NaOH (10 mM)**

Take 90 ml of 100 mM Bicine. Dilute to about 800 ml with distilled water; pH to 9.6 with NaOH and dilute to 900 ml with distilled water. Recheck pH.

**PNK (from USB Scientific)**

Add 60 µl of dilution buffer to 30 µl of PNK and mix. Store in freeze (-20)



## CHROMATOGRAPHY SOLVENTS

### D1 solvent: 0.65 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O

Weigh 89.7 g per L of milliQ water (359 g/ 4L). Use NaOH pellets to pH to 6.0. Store in carboy on shelf, with a 500 ml bottle in the fume hood.

### D3 solvent: 3.6 M Lithium formate, 8.5 M Urea (pH=3.5)

For 4 L: weigh in a large plastic beaker 2042 g of urea. Dissolve this by adding slowly to ~1000 ml of milliQ water in a 4L glass beaker – use heat.

Add 602 ml of formic acid slowly.

When this is complete, add 300 g of LiOH. Dissolve everything completely. Bring the volume to 3500 ml and pH to 3.5 using either conc HCl or NaOH pellets as appropriate.

Measure the volume using a volumetric flask; final volume is 4L. Store in carboy on the shelf.

### D4 solvent: 0.8 M LiCl, 0.5 M Tris-HCl, 8.5 M Urea (pH=8.0)

For 4 L:

Weigh 135.64 g of LiCl. Dissolve in ~1500 ml of milliQ water.

Weigh 2042 g of urea using a large plastic beaker. Add this slowly to the mixture – use heat.

Weigh 242.2 g of Tris-HCl. Add this to the mixture. Bring the volume to ~3500 ml.

pH to 8 using NaOH pellets. Measure the volume in a volumetric flask; final volume is 4 L. Store in carboy on the shelf.

### D5 solvent: 1.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=6.0)

For 2L:

Weigh 413.970 g of Sodium phosphate, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O. Dissolve in ~1400 ml of milliQ water.

Bring the volume to 2L and pH to 6 using NaOH pellets. This is stored in the 37°C incubator.

## WASTE PICKUP

How to distribute the radioactive waste:

90% high waste

8% low waste

1.5 % scintillation vials

0.5 % liquid waste