



---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**BIOLOGÍA**

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA  
DETERMINAR GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO  
EN EL EXÓN SIETE *CYP1A1\*2C*

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G O**

PRESENTA

**ANTONIO TEZOSOMOC ARAUJO SOTO**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA. REGINA MONTERO MONTOYA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

2004

---





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

*A Dios por ser.*

*A mis padres Alejandra y Simón, por su total e incondicional amor, apoyo, paciencia y esfuerzo; gracias por todo lo que han hecho por mi, el darme un hogar feliz, una educación y la libertad de hacer con mi vida lo que he querido. A mis hermanos Clara, Omar y Noe, por estar siempre conmigo.*

*Gracias por ser el motor que me mueve y la felicidad constante en mi vida.*

*"Sólo el universo mismo se compara con mi amor asía ustedes"*

*Gracias*

## DEDICATORIA

*A mis Amigos Marisol, Norma y Fernando, por cambiarme la vida y dejarme ser parte de la suya, por darme su amistad y por todo el tiempo que hemos compartido; que esto sirva de alguna manera para expresarles mi eterno y total cariño, respeto y agradecimiento.*

*A Katia por todos estos años de amistad y confianzas.*

*A mis compañeros y amigos de carrera, gracias por tantas cosas que hicieron por mi, por su tolerancia, entusiasmo y alegría, por los momentos que estimularon mi crecimiento profesional y personal, por siempre estar dispuestos a ayudarme y sobre todo por su amistad, la cual espero conservar toda la vida, gracias: Andrea, Carlos, Cynthia, Fabiola, Guillermo, Julieta, Manuela, Miriam, Ricardo y Samuel.*

*A mis maestros y todo lo que signifíco el haber estudiado en la FES-Iztacala. Especialmente quiero agradecer a la Biol. Amaya Gonzáles Ruiz , a la M. en C. Carmen Álvarez, al Biol.. Felipe de Jesús Cruz López y al Dr. Ismael Ledesma Mateos, por toda su ayuda y consejos a lo largo de la carrera, pero sobre todo, por trasmitirme su pasión por la Biología.*

*Al toda la gente que conocí durante mi estancia en el laboratorio de Herpetología-Vivario, por las nuevas amistades, por su experiencia y conocimientos trasmitidos, porque me permitieron disfrutar de una de las experiencias más gratificantes que haya tenido.*

*A Paola por la maravillosa oportunidad de conocerle.*

*A todos mis compañeros de generación, por los breves pero sin duda agradables momentos en los cuales coincidimos.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mi Alma Mater, la Universidad Nacional Autónoma de México, por un sueño cumplido y la ocasión de muchos otros.*

*A la Dra. Regina Montero Montoya, por darme la oportunidad de concluir con una etapa de mi vida profesional, por permitirme conocer parte del mundo de la toxicología, por sus consejos que me hicieron reflexionar y tratar de ser mejor, pero sobre todo, por ser una gran persona.*

*Al Dr. Rafael Camacho Carranza, que sin duda fue parte importante de este proyecto, cuyos consejos y señalamientos ayudaron no sólo a la realización de esta tesis, sino que además me permitieron aprender.*

*A mis revisores de tesis: M. en C. Maria de Jesús Laura Castañeda Partida, M. en C. Maria Eugenia Heres Pulido, Dr. Sergio Vaca Pacheco y al Dr. Diego Arenas Aranda, por aceptar ser mis sinodales y sus acertadas recomendaciones que contribuyeron a mejorar el presente trabajo.*

*A mis compañeros de laboratorio Luis Serrano García y Víctor M. Dávila Borja, por toda su ayuda, paciencia y el hacer tan agradable mi estancia en el laboratorio, lo que sin duda contribuyo para dar por terminado el mismo.*

*A Vanesa Mejía por una nueva amistad y su ayuda para la realización de esta tesis.*

## CITAS

*"El universo está hecho de historias, no de átomos". - Muriel Rukeyser*

*"La naturaleza no tiene metas; el objetivo final es sólo una fantasía humana". - Baruch Espinoza*

*"Vivimos en una sociedad profundamente dependiente de la ciencia y la tecnología y en la que nadie sabe nada de estos temas. Ello constituye una fórmula segura para el desastre".  
- Carl Sagan*

*"El Hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir". - Albert Einstein*

*"Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión". - José Ortega y Gosset*

*"Ciencia y humanismo han de ser un brazo y no un muro que separa razón y sentimiento.  
- Pablo Serrano*

*La vida es la farsa que todos debemos representar". - Arthur Rimbaud*

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
Polimorfismos en el metabolismo de xenobióticos.....	9
Polimorfismos de <i>CYP1A1</i> .....	14
Polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i> .....	16
Determinación de <i>CYP1A1*2C</i> .....	21
<b>Hipótesis .....</b>	<b>27</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>27</b>
<b>Material y métodos.....</b>	<b>28</b>
Muestra poblacional.....	28
Obtención de ADN.....	28
Determinación de la concentración de ADN.....	29
Determinación de genotipos por la PCR alelo-específica.....	29
Determinación de genotipos por RFLP.....	31
Cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas.....	33
Análisis de los oligonucleótidos.....	34
<b>Resultados.....</b>	<b>35</b>
Determinación de genotipos.....	35
Frecuencias genotípicas y alélicas.....	35
Análisis de oligonucleótidos.....	38
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>47</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>48</b>

## RESUMEN

### COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA DETERMINAR GENOTIPOS DEL POLIMORFISMO EN EL EXÓN SIETE *CYP1A1\*2C*

Araujo-Soto Antonio T.

Los genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos parecen tener un papel importante en el desarrollo de cáncer; tal es el caso del gen *CYP1A1*, implicado en la bioactivación de importantes carcinógenos ambientales como el benzo(a)pireno. Un polimorfismo de este gen conocido como *CYP1A1\*2C* ha sido ampliamente estudiado por su asociación con un incremento en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón, entre otros. No obstante, aún no ha sido establecido con precisión el papel de este polimorfismo en el desarrollo de procesos carcinogénicos y se ha discutido que la frecuencia con que se presenta en distintos grupos étnicos podría ser un factor determinante de su relación con cáncer. Por esto, la determinación precisa de las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo es de gran importancia para las investigaciones relacionadas con estudios toxicogenéticos. En el presente trabajo se llevó a cabo la determinación del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en una muestra de individuos mexicanos, empleando dos técnicas: la PCR alelo específica (ASPCR) y polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP). Nuestros resultados muestran claras diferencias entre ambas técnicas para detectar este polimorfismo y en nuestro análisis encontramos que se deben a aspectos poco controlables de la metodología. La ASPCR no es eficaz para discriminar entre el polimorfismo *CYP1A1\*2C* y el alelo normal o *CYP1A1\*1*, hecho que se refleja en su baja reproducibilidad, además de las discrepancias observadas entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas ( $p > 0.05$ ). Por su parte las frecuencias genotípicas observadas al emplear la técnica de RFLP, se encontraron en completa concordancia con las frecuencias esperadas ( $p < 0.05$ ). La técnica de RFLP resulta menos falible en la identificación de polimorfismos genéticos en estudios de epidemiología molecular, en los que se trabaja con muestras de muchos individuos. Asimismo, damos un primer reporte de la frecuencia alélica de *CYP1A1\*2C* en 55 individuos mexicanos.

## INTRODUCCIÓN

El 25 de abril de 1953 se publicó en la revista Nature uno de los artículos científicos más importantes de la historia. Se titulaba “Molecular structure of nucleic acids” y con él se culminaba el esfuerzo de muchas personas que durante varios años trabajaron para entender y desentrañar el funcionamiento de las moléculas relacionadas con la herencia (Bonfil, 2003).

A partir de entonces se inició una nueva era para la ciencia, surgiendo nuevas preguntas que, a la par con el desarrollo tecnológico, permitieron implementar estrategias concretas para responderlas. Así, a un poco más de cincuenta años de haberse resuelto la cuestión en torno a la estructura del ADN, hoy en día podemos celebrar otro hecho por demás importante; el evento, la secuencia completa del genoma humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter, 2001).

Uno de los hallazgos más importantes al secuenciar nuestro genoma, fue la ocurrencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés), los cuales son variaciones en la información genética a consecuencia del cambio de un nucleótido por otro diferente (Goodstadt y Ponting, 2001; Ingelman-Sundberg, 2001). En los seres humanos se identificaron 1.42 millones de SNPs en la secuencia preliminar (The internacional SNP map working group, 2001), aunque se estima que el número total es mayor; de manera general se piensa que se encuentran en promedio cada 1000 pb, aunque evaluaciones recientes calculan que un SNP se localiza en promedio cada 200 o 300 pares bases (es decir, el cambio de un nucleótido cada 200-300 nucleótidos) ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/get\\_html.cgi?whichHtml=overview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/get_html.cgi?whichHtml=overview)). Se estima también que cada humano tiene alrededor de 3 millones de SNPs, de los cuales, cerca de un 10% tiene implicaciones funcionales (Rockett, 2003).

La importancia de los SNPs es enorme y existen por lo menos tres ideas claras acerca de su utilidad. La primera gira en torno al estudio de la evolución, en donde por medio de la comparación de variaciones entre diferentes grupos humanos, podemos llegar a comprender mejor el origen de las mutaciones que les dieron origen y cómo es que se mantienen en ciertas poblaciones pero no en otras, así como deducir la ascendencia de las poblaciones humanas modernas (Zhao y cols., 2000; Kaessmann y cols., 1999; Jorde y cols., 2001). Una segunda utilidad es su uso como “huellas digitales”, para comprobación de parentesco o identificación de criminales (Campbell y Heyer, 2002). La tercera y más optimista utilidad es su posible aplicación en Medicina, ya que algunos SNPs pueden tener consecuencias funcionales que podrían conferir a un individuo resistencia o susceptibilidad a una infección o un mayor riesgo a desarrollar ciertas enfermedades (Hofmann, 2001; Miller y cols., 2001).

Asimismo, la presencia de polimorfismos en determinados genes puede afectar de manera individual la respuesta a una terapia con fármacos o el metabolismo de agentes tóxicos encontrados en el ambiente. Por último, la adecuada identificación de SNPs asociados a enfermedades, contribuirá de manera significativa en la comprensión de un gran número de padecimientos, en la mejora de métodos de diagnóstico y al desarrollo de nuevas y efectivas terapias (The internacional SNP map working group, 2001).

## **POLIMORFISMOS EN EL METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS**

Los humanos y animales están constantemente expuestos a una gran cantidad de agentes químicos o xenobióticos (substancias ajenas al organismo que no forman parte de sus componentes naturales), las cuales provienen de diversas fuentes como desechos industriales, medicamentos, cosméticos, aditivos de alimentos, pesticidas, productos de limpieza, armas de guerra, entre otras. Muchos de estos compuestos son relativamente

pequeños y lipofílicos, características que les permiten el ser fácil y rápidamente absorbidos por la piel, el sistema gastrointestinal o los pulmones (Sipes y Gandolfi, 1986).

Una vez dentro del organismo, se distribuyen a los tejidos en donde sufren transformaciones bioquímicas que llevan a su funcionalización en el caso de medicamentos y por último a su excreción final. En el caso de tóxicos, la funcionalización da como resultado la activación del tóxico que le permite la interacción con biomoléculas, causando daño a las células (Castagnoli y Castagnoli, 1993). Estos procesos son conocidos como biotransformación y consisten en una serie de reacciones enzimáticas (Figura 1) en las que participan grupos como citocromo P450 (CYPs) y glutatión S-transferasa (GSTs) (Lang y Pelkonen, 1999).

Las reacciones enzimáticas llevadas a cabo durante la biotransformación de xenobióticos son generalmente divididas en Reacciones de Fase I y Reacciones de Fase II: las primeras involucran procesos de oxidación, reducción e hidrólisis, agregando o exponiendo grupos funcionales (-OH, -SH, -NH<sub>2</sub>, -COOH), aumentando la solubilidad del compuesto y constituyendo el sustrato para las reacciones de Fase II. Las reacciones de Fase II son reacciones biosintéticas en las que un xenobiótico o un metabolito derivado de las reacciones de Fase I es unido a moléculas endógenas como el ácido glucurónico, ácido acético y sulfato, formando los llamados conjugados que son más hidrofílicos y por lo mismo más fáciles de eliminar (O' Flaherty, 1985; Sipes y Gandolfi, 1986).

Por otro lado, a menudo sucede que el compuesto original no es tóxico, pero es transformado en tal o bien, que la toxicidad de un agente sea incrementada por las reacciones bioquímicas, a lo que se conoce como bioactivación. Además, es importante enfatizar que no todos los xenobióticos pasan por ambas reacciones, ya que en muchos casos, un compuesto puede tener un grupo funcional capaz de formar conjugados por medio de enzimas de Fase II y de esta manera ser fácilmente eliminados, un ejemplo es

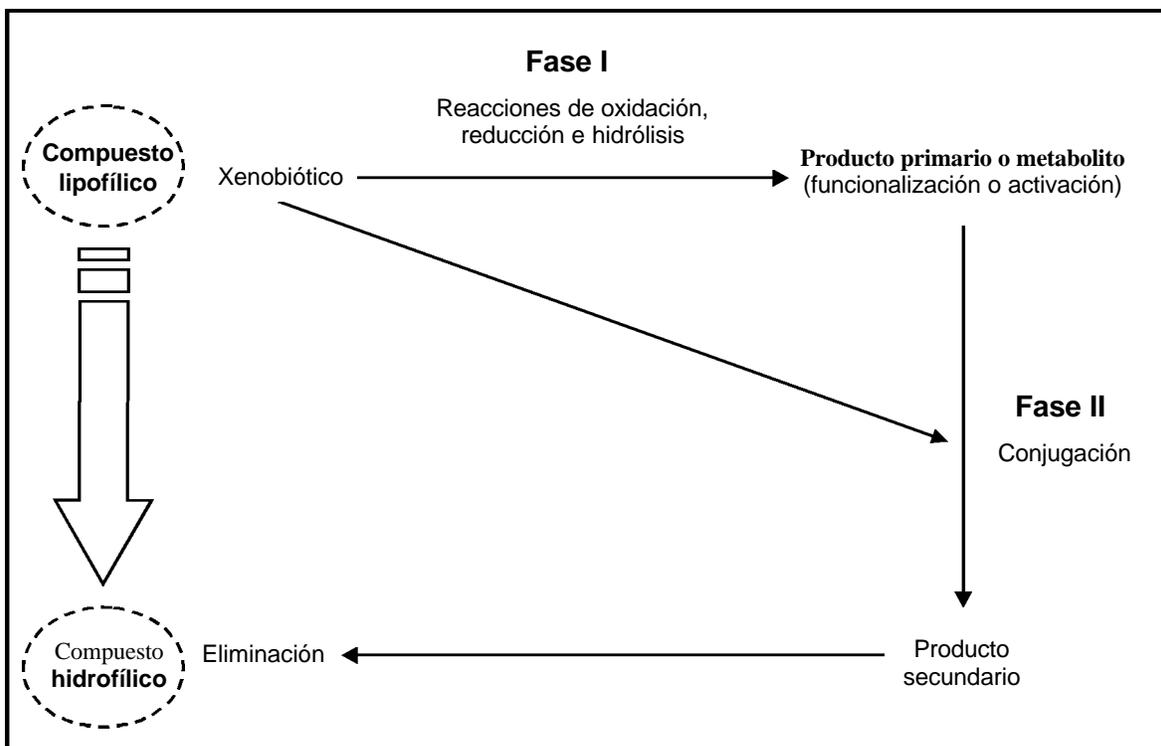
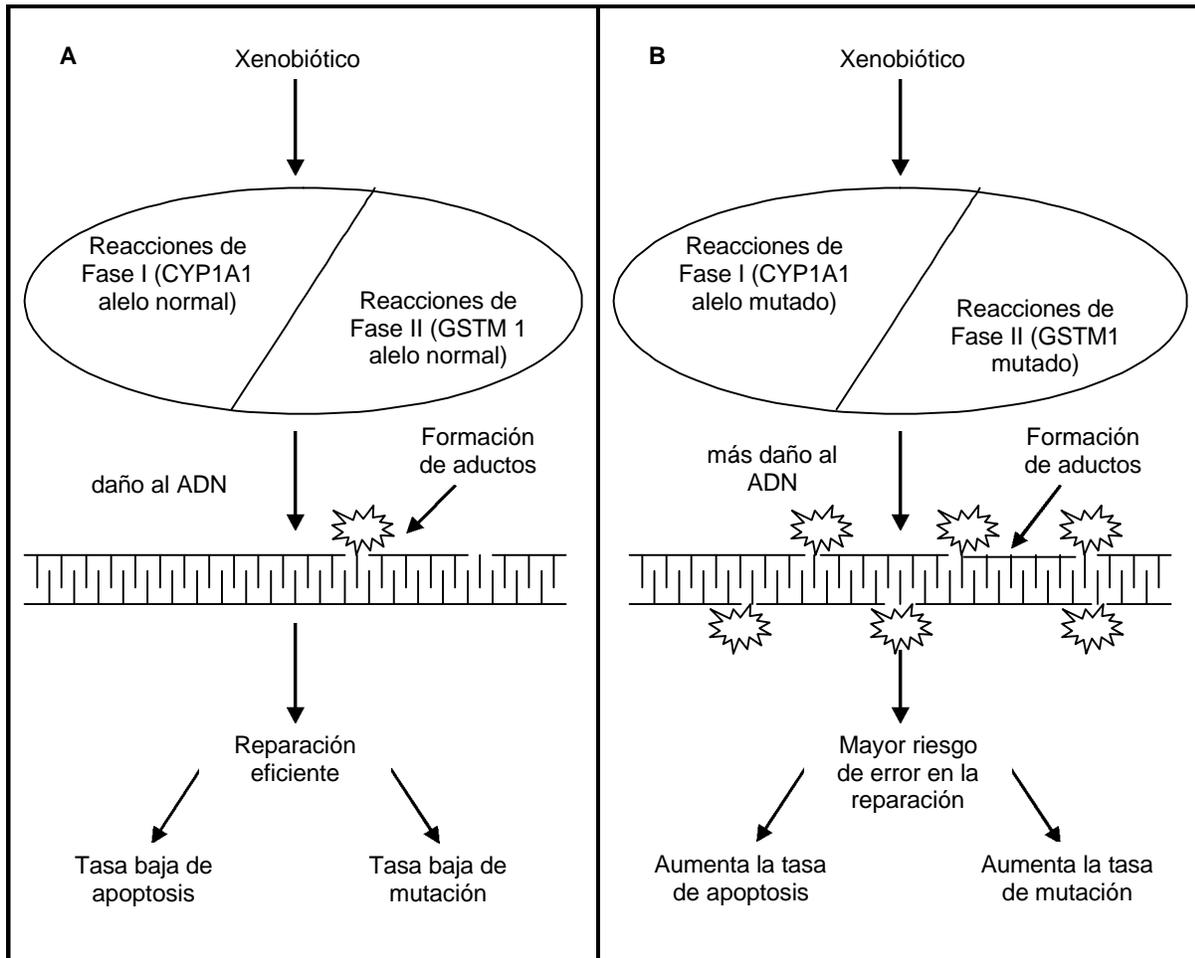


Figura 1: Vías clásicas de la biotransformación de xenobióticos.

el fenol, cuyo grupo -OH se puede conjugar con sulfato sin una previa reacción de Fase I (Lu, 1992; Manahan, 2003).

Existen factores que pueden afectar el metabolismo de xenobióticos como la edad, el género, la alimentación, la exposición ocupacional, el estado de salud y varios hábitos como el beber o fumar (Sipes y Gandolfi, 1986; Philp, 2001; Montero y cols., 2003). Sin embargo, en los últimos años y gracias a los avances en el conocimiento de la genética y otras disciplinas, se ha logrado entender de una mejor manera los factores genéticos que pueden estar implicados en el metabolismo de xenobióticos y sus posibles consecuencias en la salud. Así, hoy en día existe un consenso en aceptar que factores genéticos pueden contribuir en la susceptibilidad a desarrollar cáncer (González, 1995; Perera, 1997) y dada la función de las enzimas que participan en los procesos de biotransformación, también se admite que variaciones en los genes que codifican para



**Figura 2: Modelo teórico del efecto perjudicial al ADN por la presencia de polimorfismos en los sistemas enzimáticos del metabolismo de xenobióticos. Se muestran en la figura los casos extremos en que enzimas de Fase I y Fase II son normales (panel A) o las dos están mutadas (panel B).**

estas enzimas, a causa de SNPs o deleciones, pueden afectar el nivel de expresión, la estructura y/o la actividad de enzimas encargadas de metabolizar xenobióticos, favoreciendo la actividad tóxica, mutagénica y cancerígena de muchos compuestos sobre los organismos (Vineis y Martone, 1995; Lang y Pelkonen, 1999; Miller y cols.,2001) (Figura 2).

Por lo anterior es que en los últimos 10 años, los polimorfismos de varias enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos han sido ampliamente estudiados en distintos grupos humanos. Entre otras, se han estudiado: aldehído-deshidrogenasa

(*ALDH2*), varias isoformas de citocromo P450 como *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2E1* y *CYP2D6*, epóxido hidrolasa (*EPHX*), glutatión S-transferasas (*GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*), N-acetiltransferasas (*NAT1* y *NAT2*), NAD(P)H-quinona-oxidorreductasa (*NQO1*) y paraoxonasa (*PON1*) (Pavanello y Clonfero, 2000) (Tabla1).

**Tabla1: Características de varias enzimas polimórficas del metabolismo de xenobióticos**

Gen	Enzima	Alelos	Cambios en el gen o enzima	Metabolismo
<i>ALDH2</i>	aldehído deshidrogenasa	*1	Tipo silvestre	Alcohol etílico y tolueno
		*2	Cambio de aminoácido Glu 487 Lys	
<i>CYP2E1</i>	CYP2E1.1	*1A o C1	Tipo silvestre	Nitrosaminas, etanol, benceno y algunos medicamentos
	CYP2E1.3	*3 o C2	Cambio de nucleótido C por T en 1019	
<i>CYP2D6</i>	CYP2D6.1	*1A	Tipo silvestre	Nicotina, Nitrosaminas y algunos medicamentos como antidepresivos y antihipertensivos
		*3A	Delección de A en 2549	
		*4	Cambio de nucleótido G por A en 1846	
		*5	Delección del gen	
		*6	Delección de T en 1707	
	15 o T	Inserción de T en 138		
<i>CYP3A5</i>	CYP3A5.1	*1A	Tipo silvestre	Aflatoxina B1, benzo(a)pireno y algunos medicamentos
	CYP3A5.2	*2	Cambio de nucleótido C por A en 27289	
		*7	Inserción de T en 27131-32	
<i>EPHX</i>	epóxido hidrolasa	R o *1	Tipo silvestre	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
		H	Cambio de aminoácido Tyr por His en 113	
		Y	Cambio de aminoácido His por Arg en 139	
<i>PON1</i>	paraoxonasa	A	Tipo silvestre	Pesticidas
		B	Cambio de aminoácido Gln por Arg en 192	
		C	Cambio de aminoácido Met por Leu en 55	
<i>NAT2</i>	N-acetil transferasa	*4	Tipo silvestre	Aminas aromáticas y heterocíclicas
		*5A	Cambio de nucleótido T por C en 341 y C por T en 481	
		*5C	Cambio de nucleótido T por C en 341 y A por G en 803	
		*6A	Cambio de nucleótido G por A en 590	
<i>GSTM1</i>	glutatión S-transferasa	*1	Tipo silvestre	Pesticidas, medicamentos y compuestos electrofílicos reactivos como benzo(a)pireno diol-epóxido
		*0	Delección del gen	
<i>GSTT1</i>	glutatión S-transferasa	*1	Tipo silvestre	Pesticidas, medicamentos y compuestos electrofílicos reactivos como benzo(a)pireno diol-epóxido
		*0	Delección del gen	

## **POLIMORFISMOS DE CYP1A1**

Los citocromos P450 (CYP450) constituyen una gran superfamilia de enzimas involucradas en el metabolismo de esteroides, ácidos grasos, feromonas y metabolitos de plantas, pero también de innumerables fármacos y contaminantes ambientales que pueden resultar mutagénicos y/o carcinogénicos para el hombre (Nebert y González, 1987; Lewis, 2001), por lo que es considerado como el sistema enzimático más importante implicado en las reacciones de Fase I (Lang y Pelkonen, 1999; Wormhoudt y cols., 1999).

Estudios sobre la evolución de la familia CYP señalan que ésta es antigua y que probablemente ha existido por más de 1500 millones de años (Nebert y González, 1987), primero para metabolizar oxígeno y posteriormente adquirieron la capacidad de utilizar su potencial químico en el metabolismo oxidativo de compuestos endógenos, tales como esteroides y ácidos grasos (Lewis, 2001), mientras que las primeras formas encargadas del metabolismo de xenobióticos surgirían alrededor de 400 ó 500 millones de años, para metabolizar sustancias químicas encontradas en plantas. Se piensa que estas interacciones planta-animal son la posible causa del desarrollo de varias formas de CYP450 en animales (González y Gelboin, 1993; Lang y Pelkonen, 1999).

Las enzimas de citocromo P450 se caracterizan por tener un grupo hemo (complejo formado por un tetrapirrol cíclico y un átomo de hierro al centro) y un espectro de absorción máximo alrededor de 450nm cuando están asociados con monóxido de carbono (CO) (Lewis, 2001). Estas enzimas se han dividido en varias familias de acuerdo con su relación filogenética, la cual es dada por el grado de homología entre los distintos genes y los aminoácidos que las conforman (Nebert y González, 1987;González, 1988).

En el año 2001 se reconocían 120 familias de CYP450 en diversos organismos como bacterias (50), hongos (16), plantas (30), moluscos (2), insectos (7) y mamíferos (15) (Lewis, 2001). En los humanos se han identificado al menos 51 genes y 15 pseudogenes

de CYP450 (<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>), muchos de los cuales han sido establecidos como polimórficos, tal es el caso de *CYP1A1*, *CYP2E1* y *CYP3A4* entre otros.

De los distintos genes que componen a la superfamilia de CYP450 en humanos, uno de los más importantes es *CYP1A1*, debido al papel que desempeña en el metabolismo de varios compuestos cancerígenos (Nakachi y cols., 1991; Kawajiri, 1999). El gen codifica la enzima hidroxilasa de hidrocarburos aromáticos (AHH, por sus siglas en inglés) o más conocida como aril hidrocarbón hidroxilasa, proteína compuesta de 512 residuos de aminoácidos (Jaiswal y cols., 1985) localizada en pulmón, linfocitos y placenta, además de ser inducible en hígado (Kawajiri, 1999).

Esta enzima participa en el metabolismo de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), tales como el benzo(a)pireno (BaP), el dimetilbenzantraceno (DMBA) y las dioxinas (TCDD), considerados importantes carcinógenos ambientales (Kawajiri, 1999), además de algunos sustratos no carcinogénicos como etoxirresorufina (Wormhoudt y cols., 1999).

Su expresión está regulada por el receptor de hidrocarburos aromáticos (AHR, por sus siglas en inglés) el cual se encuentra en el citosol y al unirse a un compuesto inductor se activa y traslada al núcleo, donde se acopla a otra proteína conocida como receptor nuclear de translocación (Arnt). De este modo, ambos receptores crean un complejo que interactúa con elementos de respuesta a xenobióticos (XRE, por sus siglas en Inglés) presentes en el promotor del gen *CYP1A1*, dando paso así a la expresión del mismo (Delescluse y cols., 2000; Safe, 2001).

El gen *CYP1A1* está localizado en el cromosoma 15 en posición 15q22-24 y se divide en siete exones (Hildebrand y cols., 1985; Kawajiri, 1999). La secuencia completa del gen consta de 6311 pb y se han reconocido hasta el momento 11 secuencias polimórficas que consisten en cambios de un solo nucleótido o SNPs, los cuales de acuerdo con la

nomenclatura recomendada para polimorfismos genéticos de CYP450 en humanos (<http://www.imm.ki.se/cypalleles>) son los siguientes: *CYP1A1\*2A*, *CYP1A1\*2C*, *CYP1A1\*3*, *CYP1A1\*4*, *CYP1A1\*5*, *CYP1A1\*6*, *CYP1A1\*7*, *CYP1A1\*8*, *CYP1A1\*9*, *CYP1A1\*10* y *CYP1A1\*11*. Es importante mencionar que de estos 11 SNPs reportados, no todos existen en frecuencias mayores o iguales al 1%, por lo que queda esperar futuros estudios para saber si en verdad constituyen variantes alélicas del gen *CYP1A1* o sólo son mutaciones presentes en algunos individuos (Tabla2).

### **POLIMORFISMO *CYP1A1\*2C***

En 1991 Hayashi y colaboradores reportaron un nuevo polimorfismo para el gen *CYP1A1*, el cual se conoció inicialmente como “m2” y que actualmente es reconocido como *CYP1A1\*2C*, aunque a través del tiempo ha recibido otras nomenclaturas por diferentes autores como *CYP1A1\*2B* por Cascorbi y cols. (1996), *CYP1A1\*3* por Garte y Crosti (1999) y de manera trivial *CYP1A1* Ile/Val.

El polimorfismo *CYP1A1\*2C* se encuentra en el exón siete del gen *CYP1A1* y consiste en el cambio de A por G en la posición 4889 del gen, lo que da como resultado la sustitución de Isoleucina por Valina en el codón 462 del producto (Hayashi y cols., 1991). Los efectos del polimorfismo *CYP1A1\*2C* sobre la expresión e inducibilidad de la enzima son mayores en comparación con los observados para el alelo *CYP1A1\*1* normal o silvestre, lo que se ve reflejado en altos niveles de RNAm y por una mayor inducción debida al 3-metilcolantreno (3-Mc) en linfocitos de individuos con este polimorfismo (Cosma y cols., 1993; Crofts y cols., 1994; Taioli y cols., 1995). No obstante, con respecto a la actividad enzimática los resultados son ambiguos, ya que en algunos estudios se reporta una mayor actividad en el metabolismo de BaP (Kiyohara y cols., citado en Wormhoudt y cols., 1999), mientras que en otros casos no se observa una mayor actividad cuando se compara con el alelo normal (Zhang y cols., 1996).

**Tabla 2: Polimorfismos del gen *CYP1A1***

<i>Alelo</i>	Cambio de nucleótidos	Exón / Intrón	Cambio de aminoácido	Frecuencia	Población
<i>CYP1A1*1A</i> (Jaiswal y cols., 1985; Kawajiri y cols., 1986)				79 % <sup>a</sup> 41 % <sup>a</sup> 65 % <sup>a</sup> 63 % <sup>a</sup> 64 % <sup>a</sup>	caucásica <sup>a</sup> asiática <sup>a</sup> afro-americana <sup>a</sup> africana <sup>a</sup> latinoamericana <sup>a</sup>
<i>CYP1A1*2A</i> (Spurr y cols., 1987)	T por C 3801 (6235) <sup>c</sup>	Intrón 7		12 % <sup>a</sup> 37 % <sup>a</sup> 24 % <sup>a</sup> 24 % <sup>a</sup> 20 % <sup>a</sup>	caucásica <sup>a</sup> asiática <sup>a</sup> afro-americana <sup>a</sup> africana <sup>a</sup> latinoamericana <sup>a</sup>
<i>CYP1A1*2B</i>	T por C 3801/ A por G 2455	Intrón 7/ Exón 7	Ile 487 Val		
<i>CYP1A1*2C</i> (Hayashi y cols., 1991)	A por G 2455 (4889)	Exón 7	Ile 487 Val	9 % <sup>a</sup> 22 % <sup>a</sup> 3 % <sup>a</sup> 0 % <sup>a</sup> 16 % <sup>a</sup>	caucásica <sup>a</sup> asiática <sup>a</sup> afro-americana <sup>a</sup> africana <sup>a</sup> latinoamericana <sup>a</sup>
<i>CYP1A1*3</i> (Crofts y cols., 1993)	T por C 3205 (5996)	Intrón 7		0 % <sup>a</sup> 0 % <sup>a</sup> 8 % <sup>a</sup> 13 % <sup>a</sup> 0 % <sup>a</sup>	caucásica <sup>a</sup> asiática <sup>a</sup> afro-americana <sup>a</sup> africana <sup>a</sup> latinoamericana <sup>a</sup>
<i>CYP1A1*4</i> (Cascorbi y cols., 1996)	C por A 2453 (4887)	Exón 7	Thr 461 Asn	3 % <sup>b</sup>	caucásica <sup>b</sup>
<i>CYP1A1*5</i> (Chevalier y cols., 2001)	C por A 2461	Exón 7	Arg 464 Ser	1.7 %	caucásica (franceses)
<i>CYP1A1*6</i> (Chevalier y cols., 2001)	G por T 1636	Exón 4	Met 331 Ile	0.8 %	caucásica (franceses)
<i>CYP1A1*7</i> (Saito y cols., 2003)	Inserción de T 2346_2347		Codón de paro		japonesa
<i>CYP1A1*8</i> (Saito y cols., 2003)	T por A 2414		Ile 448 Asn		japonesa
<i>CYP1A1*9</i> (Saito y cols., 2003)	C por T 2461	Exón 7	Arg 464 Cys		japonesa
<i>CYP1A1*10</i> (Saito y cols., 2003)	C por T 2500	Exón 7	Arg 447 Trp		japonesa
<i>CYP1A1*11</i> (Saito y cols., 2003)	C por G 2546	Exón 7	Pro 492 Arg	0.8 %	japonesa

<sup>a</sup> (Garte, 1998)

<sup>b</sup> (Wormhoudt y cols., 1999)

<sup>c</sup> La numeración entre paréntesis es a partir del sitio de inicio de la transcripción .

La referencia que acompaña el nombre del alelo se refiere a su primera descripción.

Desde su descubrimiento, el polimorfismo *CYP1A1\*2C* ha sido asociado con un aumento en el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (Kawajiri, 1999), y en población

japonesa se pudo demostrar una asociación entre individuos homócigos para el polimorfismo *CYP1A1\*2C* y carcinoma de células escamosas de pulmón (Nakachi y cols., 1993; Kawajiri, 1999). No obstante, esta correlación entre cáncer y *CYP1A1\*2C* no ha sido tan contundente en otras poblaciones humanas, por ejemplo: en algunos estudios llevados a cabo en población germana y china, sólo encontraron un “posible” incremento en el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón (Cascorbi y cols., 1996; Chen y cols., 2001, Song y cols., 2001), mientras que en otras investigaciones realizadas en población finlandesa, afro-americana y china, no se encontró tal asociación (Hirvonen y cols., 1992; Taioli y cols., 1998; London y cols., 2000).

Con respecto a otros tipos de cáncer, algunos autores como Bailey y cols. (1998) hallaron que *CYP1A1\*2C* no representa un factor de susceptibilidad para cáncer de mama en mujeres caucásicas y afro-americanas. Por otro lado, Sivaraman y cols. (1994) y Park y cols. (1997), encontraron que la presencia del polimorfismo *CYP1A1\*2C* puede incrementar el riesgo de cáncer colorrectal en hawaianos y el cáncer oral en caucásicos respectivamente.

Por otro parte, recientemente se encontró que fumadores homócigos para el polimorfismo *CYP1A1\*2C* presentaron una mayor frecuencia de mutaciones en el gen *p53* (Kawajiri y cols., 1996; Lazarus y cols., 1998), el cual participa como regulador en la división celular y es considerado como un gen supresor de tumores. Esta alta frecuencia de mutación en fumadores se explica por un alto grado de bioactivación de compuestos presentes en el humo del cigarro, como el BaP, lo cual es debido a la mayor actividad catalítica reportada para la AHH cuando se presenta el cambio de Isoleucina por Valina en el codón 462 de la enzima. Otros estudios han estado encaminados a buscar una asociación entre la presencia de *CYP1A1\*2C* y daño genotóxico, mediante el empleo de varios biomarcadores de genotoxicidad como aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos, los cuales son indicadores citogenéticos de una

alteración como resultado de la exposición a xenobióticos (Salazar, 1994), encontrando resultados negativos en la mayoría de ellos, no así cuando se evaluó un biomarcador molecular, como la formación de aductos en el ADN por la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (Pavanello y Clonfero, 2000)

Con respecto a las diferencias que se observan en los distintos estudios de *CYP1A1\*2C* y su relación con un aumento en el riesgo a padecer algún tipo de cáncer, existen varias posibles causas que pueden estar influyendo en los resultados disímiles que se reportan y las cuales mencionaremos brevemente. En primer lugar está el considerar de forma aislada al polimorfismo, es decir, de manera general se estudia la presencia de esta mutación y se reporta su frecuencia sólo en combinación con el alelo nativo o *CYP1A1\*1*. Sin embargo, dado que este gen presenta varios sitios polimórficos, es posible que la susceptibilidad conferida a una persona sea la combinación de varios SNPs presentes en el gen, o la interacción con algunos otros genes, que pueden incluir a alguno de los muchos genes de susceptibilidad a cáncer distribuidos en todo el genoma (Garte, 1998). De hecho, en poblaciones asiáticas y caucásicas se llegó a pensar que la susceptibilidad en determinadas personas se debía a un desequilibrio de enlace (asociación no aleatoria de alelos en diferentes loci del mismo cromosoma) entre *CYP1A1\*2A* y *CYP1A1\*2C*, (Hayashi y cols., 1991; Hirvonen y cols., 1992), es decir, a la presencia de ambas mutaciones en un mismo alelo de un individuo, lo cual no se encontró en otros grupos poblacionales como los afro-americanos (Garte, 1998).

Otra tendencia de los últimos años es el estudio en conjunto de enzimas de primera y segunda Fase. Al respecto, la mayor cantidad de evidencia existente sugiere que la combinación de *GSTM1* nulo (delección del gen que codifica para una enzima de glutatión S-transferasa de la clase mu) y ciertas variantes alélicas de *CYP1A1* incrementan significativamente el riesgo de cáncer de pulmón en población japonesa, china y caucásica (Nakachi y cols., 1993; Kihara y cols., 1995; Hayashi y cols., citado en Fryer y

Jones, 1999; Chen y cols., 2001; Hung y cols., 2003) o confieren un mayor riesgo de sufrir mutaciones en el gen *p53* (Kawajiri y cols., 1996). No obstante, pese a estas observaciones y a la lógica de que al presentarse alterados dos de los más importantes sistemas enzimáticos involucrados en la biotransformación de xenobióticos, se puede ocasionar un mayor daño en el ADN y con ello, causar mutaciones que favorezcan el desarrollo de células cancerosas, aún no está bien establecido el efecto que estos polimorfismos combinados tendrían sobre la susceptibilidad a padecer algún tipo de cáncer.

Desde luego, no debe olvidarse el papel que desempeña el ambiente en el padecimiento de cáncer y otro tipo de enfermedades, ya que las interacciones que se dan con éste pueden ocurrir de diferentes maneras. Así, la exposición a diferentes concentraciones a las que se exponen los individuos, la exposición a una mezcla de compuestos o la exposición simultánea a distintos xenobióticos y el tiempo de exposición, son factores determinantes en la inducción del cáncer (Vineis y Martone, 1995; Vineis y cols., 1999).

Otra explicación para las discrepancias observadas, respecto al papel de *CYP1A1\*2C* y un incremento en la susceptibilidad a cáncer, hace referencia a las diferentes frecuencias alélicas que existen entre las poblaciones. Por ejemplo, como se ha mencionado, este polimorfismo es asociado con un riesgo a padecer cáncer de pulmón en población japonesa, no así en otros grupos como caucásicos o afro-americanos, lo que puede deberse a la baja frecuencia de *CYP1A1\*2C* en estas poblaciones, por lo que de querer encontrar una asociación en estudios caso-control en caucásicos, se requeriría de al menos 500 o 1000 personas para tener un valor estadístico satisfactorio, sin embargo, la mayoría de los estudios publicados no tienen un muestra poblacional que compense la baja frecuencia de este alelo (Garte, 1998).

Por último, otro aspecto importante que debe tomarse en cuenta cuando se trabaja con SNPs es que la técnica utilizada para detectar la mutación sea eficaz en su cometido o de lo contrario, se corre el riesgo de posibles errores al determinar las frecuencias alélicas en distintas poblaciones humanas (Garte, 2001). En el caso de *CYP1A1\*2C*, su determinación ha sido realizada principalmente empleando técnicas como la PCR alelo-específica (ASPCR, por sus siglas en Inglés) y los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en Inglés) en un menor grado, así como por otras técnicas como la de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP, por sus siglas en Inglés) (Shields y cols., 1993; Kato y cols., 1995; Cascorbi y cols., 1996; Kawajiri, 1999).

### **DETERMINACIÓN DE *CYP1A1\*2C***

La detección y caracterización de mutaciones ha sido históricamente importante en muchos campos de la Biología y la Medicina. Con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se revolucionó el estudio de los desórdenes genéticos y los métodos para la detección de mutaciones en los laboratorios (Eeles y Stamps, 1993).

El concepto de la PCR se debió a Kary Mullis en 1983 y se aplicó por primera vez en el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme (Mullis y Faloona, 1987; White y cols., 1989). La técnica de PCR es una estrategia “*in vitro*” que permite la amplificación de un fragmento específico de ADN en unas cuantas horas y consta de una serie de ciclos continuos e idénticos, que a su vez se dividen en tres fases que son designadas como desnaturalización, alineamiento y síntesis o extensión respectivamente.

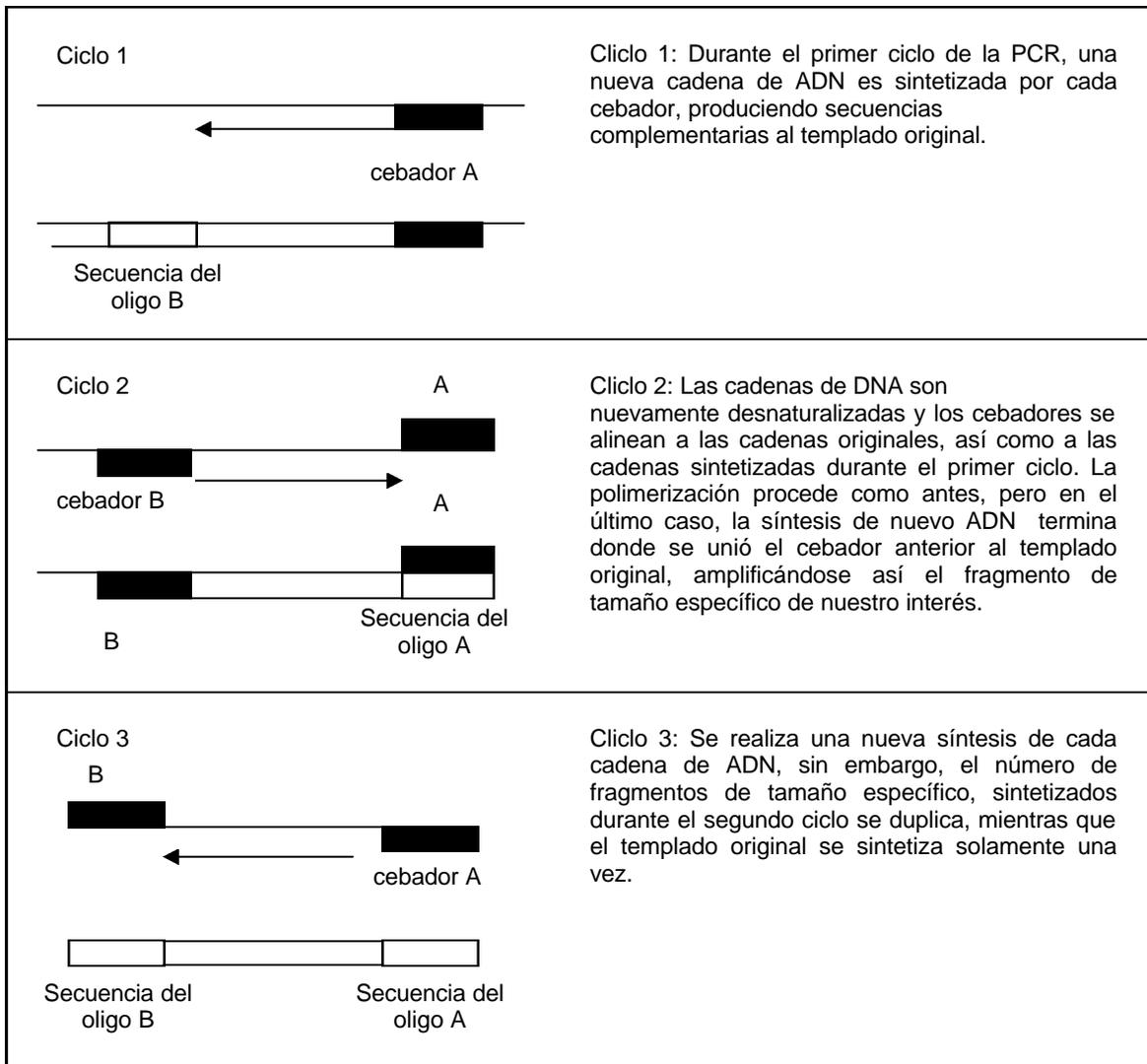
Para realizar este procedimiento se requiere de la presencia de ADN, la mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), dos oligonucleótidos o cebadores que delimitan el tamaño del fragmento que se va a amplificar y una enzima polimerasa que lleva a cabo la síntesis. La amplificación inicia con la desnaturalización mediante altas

temperaturas (94-95°C) del ADN de doble cadena en presencia de un exceso de los dos oligonucleótidos, los cuatro dNTPs y la enzima polimerasa obtenida del microorganismo *Thermus aquaticus*. En este paso, las dos cadenas se separan dando lugar a cadenas sencillas de ADN.

En la segunda fase, la temperatura de la reacción es disminuida para permitir que los oligonucleótidos iniciadores se unan por complementaridad a las cadenas sencillas de ADN por su extremo 5' y funcionen como iniciadores de la síntesis. Típicamente estos oligonucleótidos tienen secuencias diferentes entre sí y su temperatura de unión depende de la longitud y secuencia de los oligonucleótidos. Finalmente, la tercera fase consiste en la síntesis de las nuevas cadenas de ADN, por medio de la ADN polimerasa a una temperatura de 70-72°C regularmente (Figura 3). Como resultado, los productos generados durante cada ciclo sirven como moldes para las siguientes amplificaciones. De esta manera, en cada ciclo se espera una duplicación de la cantidad de ADN amplificado y el principal producto de la reacción es el fragmento de nuestro interés, que en los extremos 5' tiene incorporados a los oligonucleótidos y su longitud está definida por la distancia entre ambos iniciadores (Herrera, 1998).

Uno de los aspectos más importantes para determinar la fidelidad y rendimiento de la PCR es el grado de especificidad de la hibridación de los oligonucleótidos a la cadena molde (Ruiz, 2001). Básicamente, este parámetro va a depender de la adecuada selección de los cebadores, los cuales además, establecerán el tamaño y el sitio donde se formará el producto de la PCR; la composición de nucleótidos de los cebadores determinará también la temperatura de hibridación de éstos a sus sitios correspondientes, parámetro físico que ha demostrado ser de enorme importancia para una amplificación exitosa (Dieffenbach y cols., 1995).

Es por esto que deben hacerse algunas consideraciones al momento de la elección de los cebadores, entre ellas:



**Figura 3: Amplificación de ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Tomado de Eeles y Stamps, 1993) .**

1. *La longitud del oligonucleótido.* La especificidad es generalmente controlada por el largo del oligo. Oligonucleótidos entre 18 y 25 pb son bastante específicos y trabajan muy bien en protocolos de PCR estándar, lo que les permite ser usados en una amplia variedad de condiciones experimentales. Oligos de 15 pb o menos, son útiles sólo en un limitado número de protocolos de PCR, como en el mapeo al azar de genomas simples (dependiendo del tamaño del genoma del organismo), ya que este tipo de oligos resultan menos específicos. Por último, oligos de 28 a 35 pb son usados

cuando la región a amplificar presenta un cierto grado de heterogeneidad, puesto que un mayor número de bases en el oligo le permiten tener una mejor estabilidad y especificidad con el templado. Un ejemplo de su uso es la amplificación de secuencias tales como la del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), que se caracteriza por la presencia de variaciones en su secuencia genética (Dieffenbach y cols., 1995).

2. *El extremo 3'*. La perfecta complementariedad entre el extremo 3' de un oligo y el extremo 5' del templado es esencial, para la amplificación de un fragmento de ADN. Esto se debe a que la ADN polimerasa cataliza la adición de nucleótidos a partir de este extremo en adelante.
3. *Porcentaje de G:C*. Una idea ampliamente sostenida considera que el porcentaje de G:C debe ser entre un 40 y 60 % (Fanning y Gibbs, 1997), lo que favorece la estabilidad entre los oligonucleótidos y el templado (Eeles y Stamps, 1993). Sin embargo, de ser superior se podría favorecer la unión inespecífica entre un cebador y la cadena molde, promoviéndose la amplificación incorrecta por parte de la enzima polimerasa, sobre todo si la zona rica en G:C se encuentra en el extremo 3' o próxima a éste (Dieffenbach y cols., 1995).

Estas consideraciones pueden ayudarnos a evitar ciertos problemas, como son: la formación de estructuras secundarias u horquillas (plegamiento de un oligonucleótido consigo mismo), la complementariedad entre los cebadores y su unión con otro sitio que no sea el de nuestro interés, una amplificación inespecífica y la inestabilidad entre los oligonucleótidos y la cadena molde.

Hay varios procedimientos de amplificación que se utilizan para discriminar entre dos o más alelos de un gen basados en diferencias de un solo nucleótido o SNP (Ayyadevara, 2000). Con respecto a la determinación del polimorfismo *CYP1A1\*2C*, en la mayoría de los estudios realizados se ha empleado una técnica conocida como PCR alelo-específica (ASPCR o ASO). Esta técnica se basa en el principio de una unión incorrecta de la base

en el extremo 3' del oligonucleótido (de la cual depende la extensión de un oligo) con la secuencia blanco. De este modo se llevan a cabo dos reacciones paralelas, empleando un oligonucleótido común para ambas reacciones y oligonucleótidos específicos para cada alelo respectivamente, es decir, que se diseña un oligo que se alinea a la secuencia "normal", así como otro oligo que se une a la secuencia con la "mutación" (Rolfs y cols., 1992; Newton, 1995; McPherson y Moller, 2001).

Este método es rápido y sencillo de realizar, sin embargo, presenta ciertas desventajas como son:

- a) La falta de amplificación puede significar el fracaso de la PCR o al contrario, la amplificación de una banda puede ser resultado de un falso positivo, lo que sucede cuando las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la PCR no son las óptimas (Blömeke y Shields, 1999). Entre los factores que más afectan la reacción, se mencionan las altas concentraciones del Ion  $Mg^{2+}$ , la enzima y los oligonucleótidos, además de bajas temperaturas de alineamiento (Newton, 1995). Del mismo modo, otros componentes como la cantidad y pureza del ADN que se usa como molde y desde luego, la adecuada elección de los cebadores deben tomarse en cuenta.
- b) Se requieren dos reacciones para determinar si un individuo es heterocigoto u homocigoto para uno de los dos alelos que se estudie (Bottema y Somer, 1995).
- c) La amplificación de un segundo producto puede ser necesaria como control interno, esto es, que se puede añadir a la reacción otro par de oligos que amplifiquen una secuencia constante en el genoma, tratando de asegurar de este modo el correcto funcionamiento de la técnica (Bottema y Somer, 1995).

Por lo anterior, el uso de metodologías alternativas puede resultar más eficaz para identificar el polimorfismo de *CYP1A1\*2C*. La más usada es la técnica por polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), que de manera breve consiste en amplificar un segmento del gen de interés, en donde sabemos se encuentra el sitio del

polimorfismo que buscamos; una vez obtenido el fragmento, se digiere por medio de una enzima de restricción o endonucleasa (la cual es una enzima que reconoce y corta sitios específicos dentro del genoma). Se elige una enzima que reconozca la secuencia del sitio del polimorfismo, ya sea porque corta cuando se tiene la secuencia nativa o porque la mutación introduce un nuevo sitio de corte; de tal modo que la longitud y el número de los fragmentos de ADN que se obtienen al digerir el alelo con la mutación debe ser diferente a la longitud y número de los fragmentos que se forman de un alelo nativo (Yap y McGee, 1994).

Entre los inconvenientes que se pueden presentar al emplear esta técnica, cabe mencionar la inadecuada digestión del fragmento de ADN, a consecuencia de una temperatura que no sea la óptima para la enzima, que el amortiguador que se emplea no sea el adecuado o que el tiempo en el cual se lleva a cabo la digestión no sea el suficiente, no obstante, la especificidad con que la enzima reconoce su secuencia blanco hace muy confiable el resultado, una vez que se estandarizan las condiciones para su reacción.

Como se indicó anteriormente, la mayoría de los estudios realizados para determinar este polimorfismo han sido mediante ASPCR. Sin embargo, dadas las contrariedades que esta técnica puede presentar, como ya se explicó, y por la importancia que tiene la adecuada identificación de variantes alélicas del gen *CYP1A1* en las distintas poblaciones humanas, en el presente trabajo se realizó la comparación de los dos métodos mencionados previamente, para poder establecer cual resultaba más conveniente en términos de eficiencia, al momento de hacer la determinación del polimorfismo *CYP1A1\*2C*.

## **HIPÓTESIS**

La técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) resulta menos falible que la técnica de PCR alelo-específica (ASPCR) reportada en la literatura, para la correcta identificación del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en grupos humanos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Comparar las técnicas de PCR alelo-específica y la técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción en la determinación de *CYP1A1\*2C*.

### **Objetivos particulares**

1. Determinar el polimorfismo *CYP1A1\*2C* por la ASPCR más utilizada.
2. Determinar el polimorfismo *CYP1A1\*2C* por el método alternativo de RFLP.
3. Reportar la frecuencia alélica de *CYP1A1\*2C* en una muestra de individuos mexicanos, con uno y otro método.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Muestra poblacional

La determinación del polimorfismo *CYP1A1\*2C* se realizó en 55 individuos mexicanos de los cuales 45 presentaron antecedentes de padres y abuelos mexicanos. Del total de la muestra 47 fueron hombres y 6 mujeres (dos personas no fueron identificadas en cuanto a su género), con una edad promedio de 48 años, entre los 20 y los 84 años, todos ellos residentes del estado de Coahuila, México.

### Obtención de ADN

El ADN se obtuvo de sangre total de la siguiente forma:

#### a) *Preparación de las células y lisis celular*

A 5 ml de sangre se le añadieron 35 ml de buffer de lisis (Sacarosa 0.3 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, Tritón X-100 1%) y se mezclaron manualmente. Posteriormente se centrifugó la muestra a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación se añadieron a la pastilla 2 ml de reactivo "B" (Tris-HCl 400 mM, Na-EDTA 60 mM, NaCl 150 mM, SDS 1%) mezclando para resuspender y transfiriendo el material a un tubo estéril de 15 ml.

#### b) *Eliminación de proteínas*

Se añadió a la mezcla 0.5 ml de NaClO<sub>4</sub> 5 M y se agitó a temperatura ambiente durante 16 min. Enseguida se incubó la muestra en un termoblock a 65°C durante 30 min.

#### c) *Extracción de ADN*

Se añadieron 2 ml de cloroformo a la muestra y se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. Después se centrifugó a 3500 rpm, durante 10 min a 4°C para obtener dos fases.

d) *Precipitación de ADN*

Se tomó la fase superior (que contiene al ADN) y se transfirió a un tubo estéril de 15 ml. A continuación se adicionó un volumen igual de etanol absoluto frío y se mezcló suavemente hasta observar el ADN.

e) *Lavado de ADN*

Se transfirió el ADN con la punta de una pipeta estéril a un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml. Posteriormente se adicionó 1 ml de etanol al 80% y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min; se desechó el etanol completamente, y se dejó secar el ADN al menos 1 hora.

f) *Resuspensión de ADN*

El ADN se resuspendió en 0.15 ml de Buffer "TE" (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5, Na-EDTA 1 mM, pH 8) y se calentó a 60°C toda la noche.

### **Determinación de la concentración de ADN**

La concentración y pureza del ADN se midió a una longitud de 260 nm en un espectrofotómetro de luz UV-Visible (Perkin Elmer, modelo MBA 2000). De esta concentración se tomó un volumen de DNA para tener 10 a 20 ng en cada reacción de PCR.

### **Determinación de genotipos por la PCR alelo-específica**

La amplificación del polimorfismo *CYP1A1\*2C* se realizó utilizando dos oligonucleótidos de 20 pb cada uno (Hirvonen y cols., 1992), designados como 2a (Ile) 5'-AAG ACC TCC CAG CGG GCA AT-3' y 2g (Val) 5'-AAG ACC TCC CAG CGG GCA AC-3', el cual presentaba el cambio de base que distingue al polimorfismo *CYP1A1\*2C* en el extremo 3'

Fragmento amplificado por RFLP 760 pb

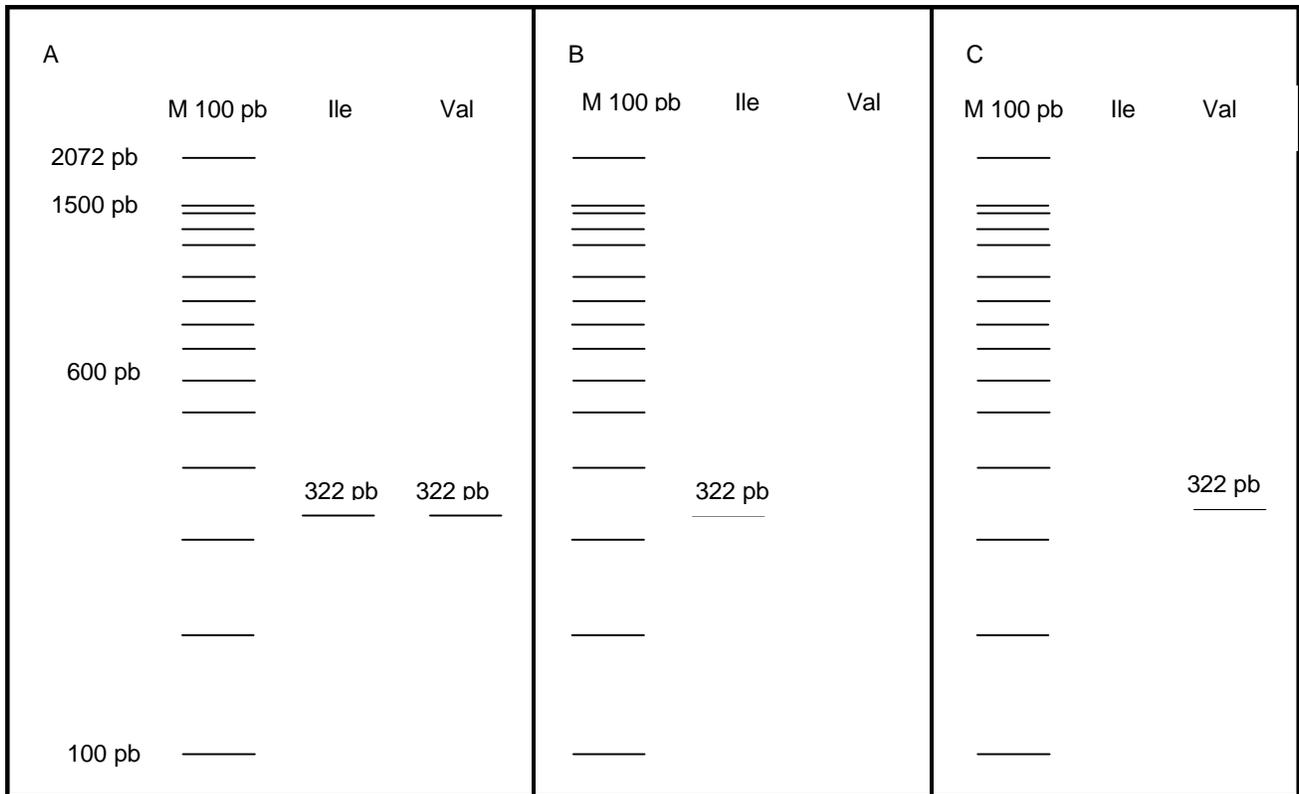
-5350- 3' -**tcagaggcctaaggacctcctaacc**ctagcaggcctcctggctcaagcacaactgggaaggctccatcagcatctatgt  
ggccctgtttacctgttctctggaggggtgagaggcaagccagggtaggggcaggcaggatcccttaggcttggccacagcccag  
atagcaaaactgcagccagatcagtgctatgagttcaggctgaaccttagaccatagggcagcctgctggctggctgccaaccag  
accaggtagacagagtctaggcctcagggtctcaagcacctaagagcgcagctgcatttgaagtgtcacagcaggcatgttcatgg  
ttagcccatagatgggggtcatgtccacctcacgccagtgccacgctgaattccaccggtgcagcaggatagccaggagagaa**agac**  
**ctcccagcgg[gcaa(t)gg]**ctcaccgatacactccgctgcccagcctgccaagataatcacctctcacttaacacctgtcgatagacca  
tcaggggtgagaaaccgttcaggttaggaactcgatgggtgaccatagctctctgtaaccagagggagacagctgaagtggcagttcagg  
gctcagaagtgtcaagtgagtgagctccagcccaaggatagaggacaggcaagcagccatggacaggaggatcaat[gcaatga  
t]tgtattaatcatatataagagccta**agaggggtggaccagcctttc**- 5' -4590-

Fragmento amplificado por PCR alelo-específica 322 pb

**Figura 4: Secuencia genética del gen CYP1A1: en negritas se encuentran los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, ( ) el sitio polimórfico, [ ] sitios de restricción para BsrDI , - - marca la posición del fragmento dentro de la secuencia del gen.**

(Figura 4). Ambos oligos se usaron en reacciones paralelas con otro oligonucleótido de 21 pb, que se une 302 pb en dirección 3' después del sitio polimórfico y el cual se designó como C53: 5'-GAA AGG CTG GGT CCA CCC TCT-3' (ver secuencia complementaria en el extremo 3' de la figura 4). El empleo de los oligos C53 y 2a (Ile) da un producto de 322 pb para el homócigo nativo, la combinación entre C53 y 2g (Val) amplifica un fragmento del mismo tamaño para homócigos con el polimorfismo, y una amplificación de ambos productos distingue a individuos heterócigos (Figura 5).

La estandarización de esta reacción se hizo con muestras de DNA de donadores del laboratorio, probando tres diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (1 mM, 2 mM y 3 mM) para la unión de los oligonucleótidos y diferentes temperaturas. Finalmente se llegó a las condiciones descritas a continuación: en un volumen total de 20 µl , la reacción se efectuó con un paso de desnaturalización a 94°C por 3 min y repitiendo 29 veces el siguiente ciclo: un paso de desnaturalización a 94°C por 30 seg y un paso de alineamiento y extensión a 70°C por 45 seg. Al término del último ciclo se realizó un paso final de



**Figura 5: Amplificación con la PCR alelo-específica: A) muestra un individuo heterocigo al presentar la amplificación con los dos cebadores, B) muestra un individuo homocigo para el alelo nativo y C) un individuo homocigo para el alelo con el SNP.**

extensión a 70°C por 3 min. A continuación, los productos de las reacciones llevadas a cabo de manera simultánea se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Invitrogen Life Technologies®).

### **Determinación de genotipos por RFLP**

La determinación del polimorfismo *CYP1A1\*2C* por RFLP se realizó amplificando inicialmente un fragmento de 760 pb por medio de dos oligonucleótidos. El primero de ellos se designó como OJA10: 5'-TCA GAG GCC TAA GGA CCT CCT AAC C-3' (diseñado y donado por el Dr. Rafael Camacho Carranza, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

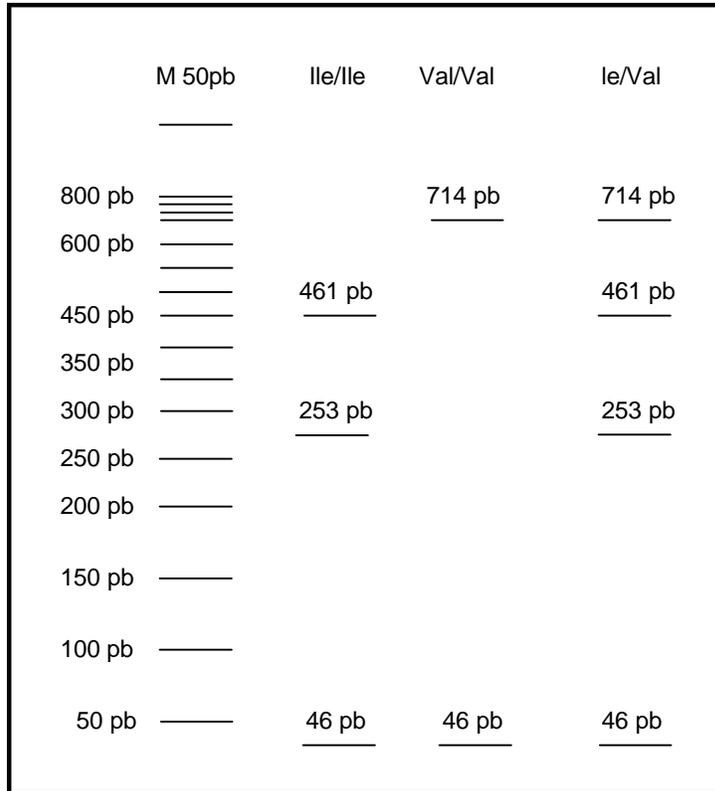


Figura 6: Patrón de bandas formadas por la enzima *BsrDI* a partir de la técnica de RFLP.

que se une 456 pb antes del sitio polimórfico, mientras que el segundo oligo fue C53 que es el mismo que se empleó para la determinación por la PCR alelo-específica (Figura 4).

La estandarización de la reacción se hizo de la misma manera que con la reacción anterior, probando el rango de concentración de  $MgCl_2$  desde 1 mM a 3 mM y diferentes temperaturas de alineamiento de los cebadores a la cadena molde, con base en la temperatura de fusión proporcionada por los fabricantes (Invitrogen Life Technologies®) y determinada en el diseño de los oligonucleótidos. Las condiciones encontradas para la amplificación de nuestras muestras fueron: en un volumen total de 25  $\mu$ l, la reacción se efectuó calentando la muestra a 94°C por 3 min e inmediatamente después se repitió 29 veces el siguiente ciclo: un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s, un paso de alineamiento a 60°C por 30 s y un paso de extensión a 72°C por 45 s. Al término del

último ciclo se realizó un paso final de extensión a 72°C por 3 min. El producto se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Invitrogen Life Technologies®).

Posteriormente el producto se sometió a digestión enzimática con la enzima *BsrDI*, la cual reconocería sitios de división en el fragmento amplificado de acuerdo con la siguiente secuencia: *gcaatgnn* (donde *n* es cualquier nucleótido). La digestión fue llevada a cabo en un volumen total de 10µl (5 µl de producto, 0.5 µl de enzima, 1µl de Buffer R<sup>+</sup> y 3.5 µl de H<sub>2</sub>O) durante 7 hrs en un termoblock a 65°C y el producto se visualizó en un gel de agarosa al 3% de la siguiente forma: los individuos homocigos para el alelo nativo presentan tres bandas de 461, 253 y 46 pb respectivamente (resultado del corte en dos sitios de restricción); los individuos homocigos para el alelo mutado sólo presentan dos bandas de 714 y 46 pb cada una (resultado del corte en un sitio de restricción) y los individuos heterocigos muestran las cuatro bandas antes mencionadas (Figura 6).

Los oligonucleótidos fueron obtenidos de Invitrogen Life Technologies® y la enzima fue comprada a New England Biolabs®. Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler Gradient, Eppendorf.

### **Cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas**

Las frecuencias genotípicas se obtuvieron al dividir el número de casos de cada genotipo entre el total de la muestra. A partir de estos datos se calcularon las frecuencias alélicas (Eguiarte, 1999). Para el caso de un locus con dos alelos, son como sigue:

$$p = D + \frac{1}{2} (H)$$

$$q = R + \frac{1}{2} (H)$$

$$p + q = 1$$

donde *p* y *q* corresponden a las frecuencias alélicas, *D* y *R* a las frecuencias de los genotipos homocigos y *H* a la de los heterocigos.

Simultáneamente se obtuvieron las frecuencias genotípicas esperadas, con base en la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Esta ley indica que en una población, a partir de cualquier frecuencia genotípica inicial (D, H, R), a la siguiente generación se da la relación:

$$D = p^2$$

$$H = 2pq$$

$$R = q^2$$

Siempre y cuando se cumplan las siguientes cuatro condiciones: a) que el tamaño de la población sea muy grande, b) que todos los apareamientos se lleven a cabo al azar, c) que todos los alelos sean igualmente viables y d) que no lleguen alelos de fuentes externas.

Se aplicó la prueba de  $X^2$  (ji-cuadrada) para probar la concordancia entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas.

### **Análisis de los oligonucleótidos**

Finalmente, se realizó un análisis a los oligonucleótidos empleados en la técnica de la ASPCR a través del programa OLIGO<sup>®</sup>, evaluando los parámetros de complementaridad entre los cebadores, contenido de G:C y temperatura de alineamiento, medidas que son de gran importancia para el adecuado desarrollo de la PCR.

## RESULTADOS

### Determinación de genotipos

De la muestra total los genotipos observados por ASPCR fueron 5 homocigotos nativos, 2 homocigotos con el cambio de nucleótido A por G y 48 heterocigotos. Por otro lado, los genotipos obtenidos mediante RFLP fueron 12 homocigotos nativos, 13 homocigotos con el SNP y 30 heterocigotos. Imágenes de los genotipos producto de la ASPCR y RFLP respectivamente son mostradas en la figuras 7 y 8, mientras que los genotipos por cada individuo pueden observarse en la tabla 3.

### Frecuencias genotípicas y alélicas

La frecuencia alélica de *CYP1A1\*2C* (q) fue de 0.47 y 0.51 a partir de las frecuencias genotípicas obtenidos por ASPCR y RFLP respectivamente, las cuales son mostradas en la tabla 4, así como las frecuencias genotípicas observadas y esperadas con cada técnica.

Al aplicar la prueba de ji-cuadrada, no se encontró concordancia entre las frecuencia genotípicas observadas y esperadas a partir de los datos derivados de la técnica de ASPCR, cuyo valor de  $X^2$  igual a 55 es mayor al valor de tablas 5.99, con un nivel de significancia de 0.05 y 2 grados de libertad. En contraste, los resultados obtenidos por RFLP mostraron una concordancia entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas, con un valor de  $X^2$  igual a 0.64, menor al valor de tablas con el mismo nivel de significancia y grados de libertad.

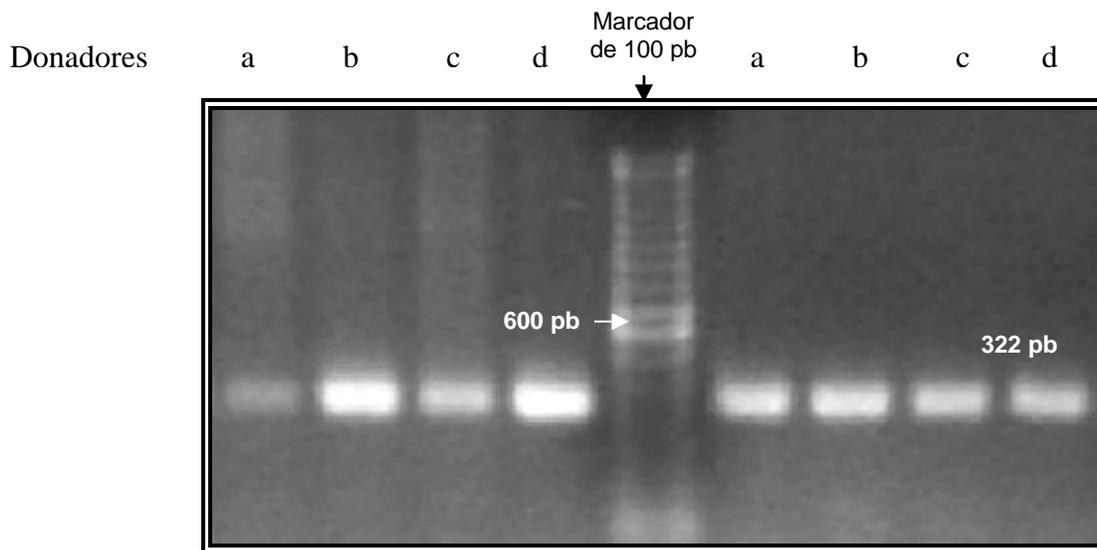


Figura 7: Muestras amplificadas con la ASPCR: a los lados del marcador de 100 pb se observa la amplificación de cuatro muestras con los oligonucleótidos 2a (Ile) (izquierda) y 2g (Val) (derecha), lo que señala a estos individuos como heterocigotos.

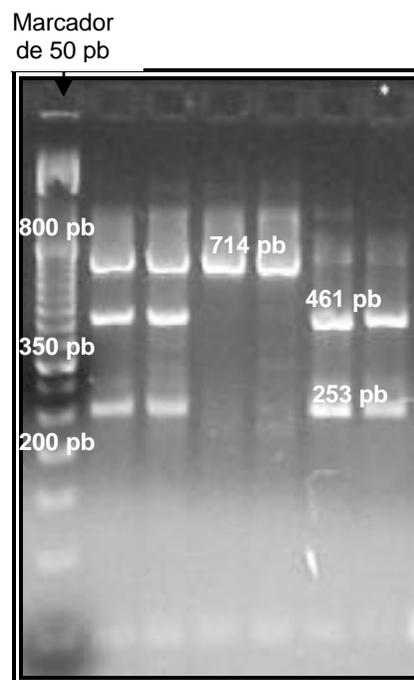


Figura 8: Muestras amplificadas por RFLP: de izquierda a derecha, los carriles 2 y 3 muestran a dos individuos heterocigotos, 4 y 5 a dos individuos homocigotos para el alelo mutado, 6 y 7 a dos individuos homocigotos para el alelo "nativo".

**Tabla 3: Determinación de genotipos por la ASPCR y por RFLP**

Muestra	Determinación de genotipos por ASPCR			Determinación de genotipos por RFLP		
	Homocigotos nativos	Heterocigotos	Homocigotos con el SNP	Homocigotos nativos	Heterocigotos	Homocigotos con el SNP
1		+		+		
2		+				+
3		+		+		
4		+		+		
5		+				+
6		+			+	
7		+		+		
8		+		+		
9		+				+
10		+			+	
11		+			+	
12	+			+		
13		+			+	
14		+			+	
15			+			+
16		+			+	
17		+			+	
18		+			+	
19		+			+	
20		+			+	
21		+			+	
22		+			+	
23		+		+		
24		+				+
25		+			+	
26			+			+
27		+				+
28		+			+	
29		+		+		
30	+				+	
31		+		+		
32	+				+	
33		+			+	
34		+				+
35		+			+	
36		+			+	
37		+			+	
38	+			+		
39	+				+	
40		+				+
41		+				+
42		+			+	
43		+			+	
44		+		+		
45		+			+	
46		+			+	
47		+				+
48		+			+	
49		+			+	
50		+				+
51		+		+		
52		+			+	
53		+				+
54		+			+	
55		+			+	
Total	5	48	2	12	30	13
Frecuencias	9%	87%	4%	22%	54%	24%

**Tabla 4: Frecuencias genotípicas y alélicas**

Frecuencias genotípicas por la técnica de ASPCR			Frecuencias genotípicas por la técnica de RFLP			
Frecuencias alélicas	p = 0.53 y q = 0.47			p = 0.49 y q = 0.51		
	Homocigotos nativos (%)	Heterocigotos (%)	Homocigotos con el SNP (%)	Homocigotos nativos (%)	Heterocigotos (%)	Homocigotos con el SNP (%)
Frecuencias observadas	9	87	4	22	54	24
Frecuencias esperadas	28	50	22	24	50	26

### **Análisis de oligonucleótidos**

Mediante el análisis con el programa OLIGO<sup>®</sup> no se encontró que los cebadores 2a (Ile) y C53, así como 2g (Val) y C53 fueran complementarios entre sí en sus extremos 3'. Por otra parte, se descubrieron 6 posibilidades de intracomplementariedad (formación de horquillas) para el oligo 2a, 6 para el oligo 2g y 14 para el oligo C53.

El contenido de G:C para 2a, 2g y C53 fue de 60%, 65% y 62% respectivamente. La temperatura de alineamiento calculada con el programa fue de 57.3°C, tanto para 2a (Ile) y C53, como para 2g (Val) y C53.

## DISCUSIÓN

La comparación entre las técnicas de la PCR alelo-específica (ASPCR) y los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), muestra claras diferencias en la determinación del polimorfismo *CYP1A1\*2C*.

Estas diferencias pueden ser percibidas a primera vista al momento de comparar el genotipo determinado en cada persona por una u otra técnica. De esta manera, al emplear la técnica de la ASPCR se obtuvo un número reducido de homocigotos, tanto para el alelo nativo como para el alelo que presenta el polimorfismo, mientras que el número de heterocigotos fue alto (próximo al 90%). A su vez, las frecuencias genotípicas calculadas a partir de estos datos resultaron muy diferentes de las frecuencias genotípicas esperadas, asumiendo que la muestra poblacional con la cual se trabajó se encuentra en equilibrio con respecto a estos dos alelos. La nula concordancia entre las frecuencias genotípicas observadas y esperadas quedó confirmada al emplear la prueba de ji-cuadrada, cuyo valor igual a 55 fue muy superior al valor obtenido en tablas, 5.99.

En contraste, el número de individuos heterocigotos y homocigotos con el alelo nativo y mutado al emplear la técnica de RFLP, fue más acorde con lo esperado para un gen con dos alelos e igual viabilidad para los fenotipos a que dan lugar. Asimismo, las frecuencias genotípicas observadas a partir de estos datos mostraron concordancia con las frecuencias esperadas, calculadas conforme a la fórmula de Hardy-Weinberg. Esto último se demostró con la prueba de ji-cuadrada, cuyo valor igual a 0.64 fue menor al valor obtenido en tablas.

Estos resultados pueden explicarse por las diferencias en la determinación del polimorfismo con cada técnica, lo cual se tradujo en los diferentes valores obtenidos al momento de calcular las frecuencias genotípicas y alélicas. El método por ASPCR mostró muy poca especificidad para reconocer uno u otro alelo, lo que se reflejó en un alto

número de heterocigotos. Además, este procedimiento fue poco reproducible, pues al repetir el método bajo las mismas condiciones, con muestras de ADN obtenido de miembros del laboratorio, se obtuvieron resultados variables, p. e., la amplificación de cada alelo mostraba diferente intensidad cada vez, aunque por lo general, el genotipo es heterocigoto. Por el contrario, al repetir el procedimiento por RFLP siempre se obtuvo el mismo genotipo para cada muestra.

Por otro lado, debido a la importancia que tiene la correcta selección de los oligonucleótidos en un protocolo para PCR, y más aún, en una variante como la ASPCR, se llevó a cabo un análisis de los oligonucleótidos utilizados, con el propósito de establecer en qué aspectos estaría fallando el procedimiento. De este modo, el análisis realizado a los oligonucleótidos 2a (Ile), 2g (Val) y C53 reveló lo siguiente:

La complementaridad entre los cebadores en sus extremos 3' no reveló ningún problema que lograra impedir el correcto funcionamiento de la técnica. Por su parte, la potencial formación de horquillas que se observó en cada uno de los cebadores, tampoco parece ser la causa de la amplificación inespecífica por parte de la ASPCR, ya que con estos eventos seguramente lo que obtendríamos sería una disminución del producto amplificado por la formación de dímeros (Rychlik, 2000); quizás esto sí explicaría el por qué a menudo la amplificación de una de las muestras hechas en paralelo era menos eficiente que en la otra, lo cual se veía en el gel de agarosa como una banda intensa para un alelo y una banda tenue para el otro, como se observó en la figura 7 con la muestra "a".

En lo relativo al contenido de G:C, éste fue de 60% y 65% para 2a (Ile) y para 2g (Val) respectivamente, valores que resultan superiores a lo recomendado en la literatura (Fanning y Gibbs, 1997). Este mayor contenido de G:C y la forma en que se encuentran distribuidos los diferentes pares de bases en estos oligonucleótidos pudo influir en la inespecificidad observada, pues son ricos en G:C en la región cercana al extremo 3'

terminal. Esto hace que los oligonucleótidos sean especialmente estables en su unión a la cadena molde y la amplificación ocurriría independientemente de que la T o la C en el extremo 3' estuvieran bien apareadas, es decir, que cualquiera de los alelos podría amplificarse con uno u otro oligonucleótido.

También se observó que el oligonucleótido 2a presenta una T en el extremo 3' y se ha reportado que el apareamiento de una T con una G (si el DNA correspondiera a un alelo con la mutación) tiene un mínimo efecto sobre el producto de la PCR y permite una eficiente amplificación independientemente del nucleótido correspondiente en la cadena molde (Kwok y cols., 1990). Si esta hubiera sido la única causa de error, se habrían encontrado únicamente falsos positivos nativos (Ile) y ningún falso positivo mutado (Val), pero esto no fue así. En nuestras determinaciones tuvimos 14 falsos positivos (Ile) y 10 falsos positivos (Val).

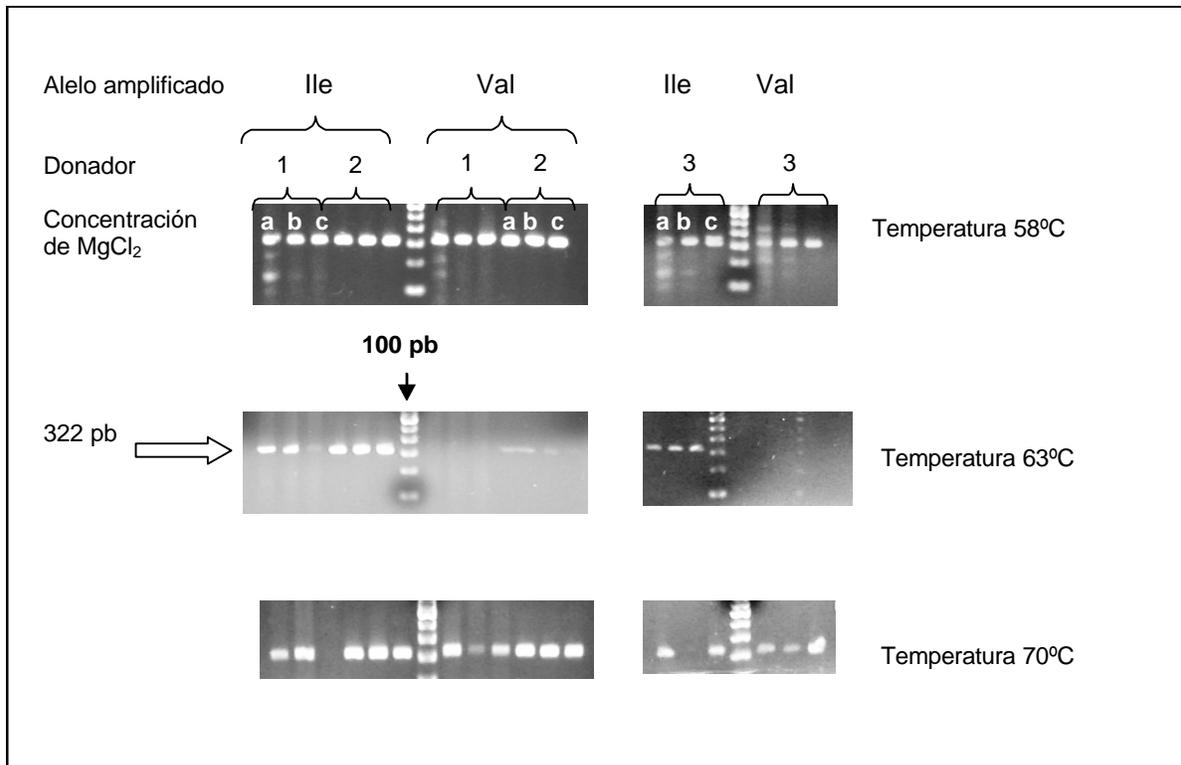
Estos resultados son consistentes con las dos posibilidades planteadas anteriormente: el alto contenido de G:C cerca del extremo 3' de los oligonucleótidos específicos 2a (Ile) y 2g (Val), que causa falsos positivos de los dos alelos, así como la presencia de una T en el extremo 3' de 2a (Ile), que causa una amplificación preferente del alelo Ile, aunque el alelo realmente sea Val.

Los últimos parámetros evaluados fueron la temperatura de alineamiento y la salinidad utilizadas en la reacción. De acuerdo con Hirvonen y cols (1992), en el cual nos basamos, la temperatura de alineamiento era de 70°C y 60 mM de salinidad, mientras que la temperatura de alineamiento óptima calculada con el programa OLIGO<sup>®</sup> resultó ser de 57.3°C, tanto para 2a (Ile) y C53, como para 2g (Val) y C53; al mismo tiempo, la salinidad óptima calculada fue 50 mM.

Aunque ya habíamos probado diferentes temperaturas y concentraciones de MgCl<sub>2</sub> cuando estandarizamos la ASPCR, quisimos ver cómo estos parámetros influirían en la determinación de tres genotipos conocidos (un heterócigo y un homócigo para cada uno

de los alelos) por RFLP. Probamos tres diferentes temperaturas: 58°C, 63°C y 70°C, y contenido de MgCl<sub>2</sub>: 3 mM, 2 mM y 1 mM, y encontramos que a 63°C y 70°C la amplificación era más limpia, mientras que a 58°C, se obtuvo nuevamente una gran cantidad de amplificaciones inespecíficas o “mispriming”. Sin embargo, a la temperatura de 63°C el alelo mutado casi no se amplificó, sólo la muestra del donador 2 mostró una débil amplificación (Figura 9). La concentración de MgCl<sub>2</sub> aparentemente alteró la eficiencia de la amplificación, sólo en las temperaturas de 63 y 70°C, en las que algunas de las reacciones de cada donador se vieron afectadas, no obstante, su efecto no contribuyó a mejorar la especificidad de cada cebador por su correspondiente alelo. Así, a 58°C los tres donadores resultaron heterócigos con las tres concentraciones de MgCl<sub>2</sub>, a 63°C los tres fueron homócigos Ile/Ile, y a 70°C, dependiendo de la concentración de MgCl<sub>2</sub>, el donador 1 fue heterócigo a 3 mM, dudosamente heterócigo a 2 mM y homocigoto Val/Val a 1 mM. Estas variaciones hacen muy difícil confiar en este método, en particular si no se tiene un conocimiento previo de los genotipos.

Como puede advertirse, la diferencia entre la temperatura de alineamiento tomada de la literatura (y elegida por nosotros durante la estandarización del método) y la calculada mediante el programa OLIGO<sup>®</sup> resultó ser de 12.7°C. No obstante, en la literatura especializada se menciona que temperaturas mayores permiten una mejor especificidad de alineamiento entre los oligonucleótidos y el templado (Eeles y Stamps, 1993); este razonamiento podría inducir a seleccionar como óptima la temperatura de 70°C, cuando en realidad, ninguna de las temperaturas probadas, ni las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> dieron los resultados esperados, y en cambio, se aprecia que las condiciones probadas no favorecen la especificidad de los cebadores para distinguir uno u otro alelo.



**Figura 9: Efecto de la temperatura y concentración de MgCl<sub>2</sub> sobre la eficiencia de la ASPCR: a) 3mM de MgCl<sub>2</sub>, b) 2mM de MgCl<sub>2</sub> y c) 1mM de MgCl<sub>2</sub>. El genotipo de cada donador, determinado por RFLP fue: (1) Val/Val; (2) Ile/Val; (3) Ile/Ile**

Este resultado parece indicar que el diseño de los oligonucleótidos no es el óptimo, por lo que creemos que la región rica en G:C, tres nucleótidos antes del extremo 3' terminal de los oligonucleótidos 2a (Ile) y 2g (Val) podría conferir una gran estabilidad entre los cebadores y la cadena molde, favoreciendo la amplificación independientemente de la T o la C en el extremo 3' como ya se mencionó anteriormente, dando por resultado la inespecificidad de la amplificación con los consecuentes falsos positivos para uno y otro alelo.

Otro factor menos controlable que podría afectar la amplificación sería la presencia de componentes que afecten el correcto funcionamiento de la enzima polimerasa, elementos derivados de las propias muestras o del método utilizado para la extracción del ADN (Blömeke y Shields, 1999; McPherson y Moller, 2001), puesto que se ha reportado que

ciertos componentes en la sangre como las porfirinas pueden inhibir la actividad de la enzima. Además, durante la extracción pueden retenerse algunos elementos como sales de Na (NaCl, p.e.) (McPherson y Moller, 2001) que podrían repercutir en la eficiencia de una técnica como la ASPCR, ya que las muestras de ADN de cada persona presentarían condiciones muy particulares que podrían afectar la acción de la polimerasa o la unión de los cebadores con la cadena molde, más aún cuando la unión de un oligo es dependiente de un solo nucleótido como fue el caso con la ASPCR.

Acerca de la técnica de RFLP debe decirse que resultó más conveniente su empleo en la determinación de genotipos: todas las muestras fueron eficientemente amplificadas en una sola reacción, fue reproducible y dio resultados claros.

Hay que hacer notar respecto al uso de esta técnica, que la presencia del polimorfismo *CYP1A1\*4* situado dos nucleótidos antes de *CYP1A1\*2C* (y que consiste en un cambio de C por A) no afectaría la determinación de genotipos por medio de la enzima *BsrDI*, puesto que el cambio de base producto de *CYP1A1\*4* no cambiaría el marco de lectura para esta enzima.

En relación con las frecuencias alélicas encontradas para *CYP1A1\*2C* y *CYP1A1\*1*, sólo tomaremos en cuenta el valor derivado de la técnica de RFLP, dado que el resultado obtenido por la técnica de la ASPCR no se puede considerar correcto, conforme a lo ya explicado. La frecuencia alélica observada de *CYP1A1\*2C* es elevada, 51 %, comparada con la frecuencia reportada para algunos grupos americanos, como brasileños y poblaciones latinoamericanas establecidas en los Estados Unidos con valores entre 11 y 16 % (Garte, 1998; Gaspar y cols., 2002a), que son intermedios entre los encontrados en caucásicos y asiáticos.

Esta variación indica que cada grupo que se ha estudiado hasta el momento de la población latinoamericana, no es representativo y que existen diferencias regionales que podrían atribuirse a la riqueza de mezclas que han ocurrido a lo largo de la historia en

cada uno de estos países. Dentro de nuestro país tan solo, es de esperar encontrar diferentes frecuencias alélicas en cada región, debido a la composición étnica de cada zona: Norte de México, Centro de México, la región del Golfo, y la Costa Occidental, cada una de las cuales presentan una mezcla poblacional diferente (Serrano, 1995).

En apoyo de lo anterior, la frecuencia con que *CYP1A1\*2C* se ha presentado en poblaciones americanas es superior al encontrado en otras poblaciones humanas y, aunque se podrían esperar algunos errores de determinación debido a las técnicas empleadas, estudios recientes realizados en grupos suramericanos nativos de Chile, Brasil y Paraguay han reportado frecuencias más altas para este polimorfismo de alrededor de 54 y 100 % (Kvitko y cols., 2000; Gaspar y cols., 2002*b*). Lo que ha hecho suponer a los investigadores varias hipótesis en torno al origen de este polimorfismo y su elevada frecuencia en estos grupos. Algunas de éstas plantean un probable origen africano (Gaspar y cols., 2002*a*), mientras que otros autores como Garte (1998) han encontrado evidencia de su origen después de la divergencia entre grupos africanos y no africanos. Finalmente, una tercera explicación es atribuida a la selección por diferentes factores ambientales como la dieta, enfermedades parasitarias y la exposición a químicos (Nebert, 1997; Kvitko y cols., 2000).

Por otro lado, también debería replantearse la idea concebida acerca del término “alelo nativo”, el cual suele utilizarse en referencia al alelo más común en la primera población que se estudia, sin embargo, en muchas ocasiones el alelo más abundante puede resultar raro en ciertas poblaciones. Un ejemplo de esto es el gen *NAT2*, cuyo fenotipo de acetilación rápida se encuentra presente en cerca del 90% de los japoneses, pero sólo en un 10% de poblaciones mediterráneas (Nebert, 2000).

Por lo demás cabe mencionar que no existen muchos estudios con los cuales podamos comparar nuestro trabajo, el único estudio previo al presente fue realizado por

Gaspar y cols. (2002a) en una muestra de población brasileña, no reportando ninguna diferencia entre los resultados obtenidos mediante la técnica de la ASPCR y RFLP.

## CONCLUSIONES

En este estudio se presenta información referente al uso de dos técnicas empleadas en la determinación de *CYP1A1\*2C*, un polimorfismo del gen *CYP1A1* que se ha relacionado con un aumento en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de pulmón, entre otros.

Nuestros resultados nos permiten concluir que el empleo del método de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) resulta más conveniente que la técnica de la PCR alelo-específica (ASPCR) en la determinación de polimorfismos genéticos, ya que disminuye la incertidumbre que pueda tenerse respecto a los resultados obtenidos en un estudio, pues los oligonucleótidos que se utilizan pueden diseñarse mejor, buscarse una óptima especificidad, no dependen del sitio del polimorfismo y se puede asegurar que se amplifique eficientemente el fragmento de ADN de interés.

Por otra parte, la frecuencia alélica del polimorfismo *CYP1A1\*2C* encontrada en este trabajo es otra prueba más de las diferencias que pueden existir en cada población humana con respecto a este polimorfismo, y muy probablemente a otros polimorfismos. En México, dadas las condiciones de interacción entre diversos grupos humanos que han prevalecido durante siglos, cabe esperar una alta heterogeneidad en nuestro acervo genético, lo cual es sin duda de sumo interés y debe servir para estimular los estudios enfocados a conocer de manera particular nuestro fondo genético y el de otros grupos, aspecto que resulta de gran importancia y necesidad en tiempos actuales.

Por último, exhortamos por continuar y aumentar el número de estudios en Toxicología Genética, que se requieren no sólo desde un punto de vista científico sino también social, los cuales en conjunto deben permitir mejorar las condiciones de vida de las personas, sobre todo en un país como el nuestro, en donde mucho del conocimiento básico aplicado a nuestra realidad es aún insuficiente.

## REFERENCIAS

### A/ U

1. Ayyadevara, S., J. J. Thaden y R. J. S. Reis (2000). Discrimination of primer 3' –nucleotide mismatch by Taq DNA polymerase during polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 248: 11-18.

### B/ U

2. Bailey, L. R., N. Roodi, C. S. Verrier, C. J. Yee, W. D. Dupont y F. F. Part (1998). Breast cancer and *CYP1A1*, *GSTM1*, and *GSTT1* polymorphisms: evidence of a lack of association in caucasians and african Americans. *Cancer Research* 58: 65-70.
3. Blömeke B. y P. G. Shields (1999). Laboratory methods for the determination of genetic polymorphisms in humans. En: Ryder, W. (eds.). *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon , France. pp. 133-147.
4. Bonfil, O. M. (2003). La construcción de la doble hélice: de la nucleína al ADN. *Ciencias* 71: 4-15.
5. Bottema, C. D. K., y S. S. Sommer (1995). PCR amplification of specific alleles: rapid detectionof known mutations and polymorphisms. *Mutation Research* 288: 93-102.

### C/ U

6. Campbell, A. M. y L. J. Heyer (2002). *Discovering: Genomics, proteomics and bioinformatics*. Benjamin Cummings, San Francisco, USA. pp. 76-88.
7. Cascorbi, I., J. Brockmöller y I. Roots (1996). A C4887A polymorphism in exon 7 of human *CYP1A1*: Population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Research* 56: 4965-4969.
8. Castagnoli, N. Jr. y K. P. Castagnoli (1993). Biotransformation of xenobiotics to chemically reactive metabolites. En. Welling P. G. y. F. A. de la Iglesia (eds.). *Drug Toxicokinetics*. Marcel Dekker, New York, USA. pp. 43-68.

9. Chen, S., K. Xue, L. Xu, G. Ma y J. Wu (2001). Polymorphisms of the *CYP1A1* and *GSTM1* genes in relation to individual susceptibility to lung carcinoma in chinese population. *Mutation Research Genomics* 458: 41-47.
10. Chevalier, D., D. Allorge, J. M. Lo-Guidice, C. Cauffiez, M. Ihermitte, J. J. Lafitte y F. Broly (2001). Human Mutation: Mutation and Polymorphism Report No. 232.
11. Cosma, G., F. Crofts, E. Taioli, P. Toniolo y S. Garte (1993). Relationship between genotype and function of the human *CYP1A1* gene. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 40: 309-316.
12. Crofts, F., G. N. Cosma, D. Currie, E. Taioli, P. Toniolo y S. J. Garte (1993). A novel *CYP1A1* gene polymorphism in African-Americans. *Carcinogenesis* 14 (9): 1729-1731.
13. Crofts, F., E. Taioli, J. Trachman, G. N. Cosma, D. Currie, P. Toniolo y S. J. Garte (1994). Functional significance of different human *CYP1A1* genotypes. *Carcinogenesis* 15 (12): 2961-2963.

#### **D/ U**

14. Delescluse, C., G. Lemaire, G. de Sousa y R. Rahmani (2000). Is *CYP1A1* induction always related to AHR signaling pathway?. *Toxicology* 153: 73-82.
15. Dieffenbach, C. W., T. M. J. Lowe y G. S. Dveksler (1995). General Concepts for PCR primer design. En: Dieffenbach, C. W. y G. S. Dveksler (eds.). PCR primer: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, E. U. pp. 131-142.

#### **E/ U**

16. Eeles, R. A. y A. C. Stamps (1993). Polymerase chain reaction (PCR): The technique and its applications. R. G. Landes Company, Austin, USA. pp. 33-54.
17. Eguiarte, L. E. (1999). Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En: Núñez-Farfán, J. y L. E. Guiarte (comp.). La evolución biológica. Universidad Nacional Autónoma de México, México. pp. 35-50.

**F/ U**

18. Fanning, S. y R. A. Gibbs (1997). PCR in genome analysis. En: Birren, B., E. D. Green, S. Klapholz, R. M. Myers y J. Roskams (eds.). *Genome analysis : a laboratory manual*. Vol. I. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. pp. 249-299.
19. Fryer, A. A. y P. W. Jones (1999). Interactions between detoxifying enzyme polymorphisms and susceptibility to cancer. En: Ryder, W. (ed.). *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon , France. pp. 3003-321.

**G/ U**

20. Garte, S. F. y Crosti (1999). A nomenclature system for metabolic gene polymorphisms. En: Ryder, W. (ed.). *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon , France. pp. 5-12.
21. Garte, S. (1998). The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphism: the example of *CYP1A1*. *Carcinogenesis* 19 (8): 1329-1332.
22. Garte, S. (2001). Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 10: 1239-1248.
23. Gaspar, P. A., K. Kvitko, L. G. Papadópoli, M. H. Hutz y T. A. Weimer (2002a). High frequency of *CYP1A1\*2C* allele in Brazilian populations. *Human Biology* 74 (2): 235-242.
24. Gaspar, P. A., M. H. Hutz, F. M. Salzano, K. Hill, A. M. Huetado, M. L. Petzi-Erler, L. T. Tsuneto y T. A. Weimwr (2002b). Polymorphisms of *CYP1A1*, *CYP2E1*, *GSTM1*, *GSTT1*, and *TP53* genes in amerindians. *American Journal of physical anthropology* 119: 249-256.
25. González, F. J. (1988). Molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological Reviews* 40 (4): 243- 288.

26. González, F. J. y H. V. Gelboin (1993). Role of human cytochrome P-450s in risk assessment and susceptibility to environmentally based disease. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 40: 289-308.
27. González, F. J. (1995). Genetic polymorphism and cancer susceptibility: Fourteenth Sapporo Cancer Seminar. *Cancer Research* 55: 710-715.
28. Goodstadt, L. y C.P. Ponting (2001). Sequence variation and disease in the wake of the draft human genome. *Human Molecular Genetics* 10 (20): 2209-2214.

## H/ U

29. Hayashi, S., J. Watanabe, K. Nakachi y K. Kawajiri (1991). Genetic linkage of lung cancer-associated *Msp* I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *Journal Biochemistry* 110: 407-411.
30. Herrera, B. M. T. (1998). Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico de la tuberculosis. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 77 p.
31. Hildebrand, C. E., F. J. Gonzalez, O. W. McBride y D. W. Nebert (1985). Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-inducible cytochrome P<sub>1</sub>-450 gene to chromosome 15. *Nucleic Acids Research* 13 (6): 2009-2015.
32. Hirvonen, A., K. Husgafvel-Pursiainen, A. Karjalainen, S. Anttila y H. Vainio (1992). Point-mutational *Msp*I and ile/val polymorphisms closely linked in the *CYP1A1* gene: Lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1: 485-459.
33. Hofmann, E. (2001). What can medicine learn from the human DNA sequence?. *Biochemistry (Moscow)* 66 (10): 1144-1152.
34. Hung, R. J., P. Boffetta, J. Brockmüller, D. Butkiewicz, I. Cascorbi, M. L. Clapper, S. Garte, A. Haugen, A. Hirvonen, S. Anttila, I. Kalina, L. Le Marchand, S. J. London, A. Rannung, M. Romkes, J. Salagovic, B. Schoket, L. Gaspari, E. Taioli (2003). *CYP1A1* and *GSTM*

genetic polymorphisms and lung cancer risk in caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis* 24 (5): 875-882.

**I/ U**

35. Ingelman-Sundberg, M. (2001). Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters* 120: 259-268.

36. Inoue, K., T. Asao y T. Shimada (2000). Ethnic-related differences in the frequency distribution of genetic polymorphisms in the *CYP1A1* and *CYP1B1* genes in Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* 30: 285-295.

37. International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome. *Nature* 409: 860-921.

**J/ U**

38. Jaiswal, A. K., F. J. González y D. W. Nebert (1985). Human P1-450 gene sequence and correlation of mRNA with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism. *Nucleic Acids Research* 13 (2): 4503-4520.

39. Jorde, I. B., W. S. Watkins y M. J. Bamshad (2001). Population genomics: a bridge from evolutionary history to genetic medicine. *Human Molecular Genetics* 10 (20): 2199-2207.

**K/ U**

40. Kaessmann, H., F. Heisig, A. von Haeseler y S. Pbo(1999). DNA sequence variation in a non-coding region of low recombination on the human X chromosome. *Nature Genetics* 22: 78–81.

41. Kato, T., H. Inatomi, A. Nagaoka y A. Sugita (1995). Cytochrome P4501A1 gene polymorphism and homozygous deletion of the glutathione S-transferase M1 gene in urothelial cancer patients. *Carcinogenesis* 16 (3): 655-657.

42. Kawajiri, K., J. Watanabe, O. Gotoh, Y. Tagashira, K. Sogawa y Y. Fujii-Kuriyama (1986). Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *European Journal Biochemistry* 159: 219-225.
43. Kawajiri, K., H. Eguchi, K. Nakachi, T. Sekiya y M. Yamamoto (1996). Association of *CYP1A1* germ line polymorphisms with mutations of the *p53* gene in lung cancer. *Cancer Research* 56: 72-76.
44. Kawajiri, K. (1999). *CYP1A1*. En: Ryder, W. (ed.). *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon , France. pp. 159-172.
45. Kihara, M., M. Kihara y K. Noda (1995). Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of *CYP1A1* and *GSTM1* gene polymorphisms in a Japanese population. *Carcinogenesis* 16 (10): 2331-2336.
46. Kvitko, K., J. C. B. Nunes, T. A. Weimer, F. M. Salzano y M. H. Hutz (2000). Cytochrome *P4501A1* polymorphisms in south american indians. *Human Biology* 72 (6): 1039-1043.
47. Kwok, S., D. E. Kellogg, N. McKinney, D. Spasic, L. Goda, C. Levenson y J. J. Sninsky (1990). Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* 18(4): 999-1005.

## L/O

48. Lang, M. y O. Pelkonen (1999). Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. En. Ryder, W. (ed.). *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon , France. pp. 13-22.
49. Lazarus, P., S. N. Sheik, Q. Ren, S. P. Schantz, J. C. Stern, J. P. Richie, Jr., y J. Park (1998). *p53*, but not *p16* mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphic genotypes and patient tobacco use. *Carcinogenesis* 19 (3): 509-514.
50. Lewis, D. F. V. (2001). *Guide to Cytochromes P450: Structure and function*. Taylor & Francis, London. 215 p.

51. London, S. J., J. M. Yuan, G. A. Coetzee, Y. T. Gao, R. K. Ross y M. C. Yu (2000). *CYP1A1I462V* genetic polymorphism and lung cancer risk in a cohort of men in Shanghai, China. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 9 (9): 987- 991.
52. Lu, F. C. (1992). Toxicología básica: riesgos por exposición a sustancias toxicas. Harla, México. pp. 21-30.

## M/ U

53. Manahan, S. E. (2003). Toxicological chemistry and biochemistry. 3ed. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA. 425 p.
54. McPherson, M. J. y S. G. Moller (2001). PCR. Bios Scientific Publishers, New York, USA.276 p.
55. Miller III, M. C., H. W. Mohrenweiser y D. A. Bell (2001). Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicology Letters* 120: 269-280.
56. Montero, R., L. Serrano, V. M. Dávila, A. Ito y A. Plancarte (2003). Infection of rats with *Taenia taeniformis* metacestodes increases hepatic *CYP1A1*, *CYP2B1* and COH isoformas and increases the genotoxicity of the procarcinogens benzo(a)pyrene, ciclofosphamide and aflatoxin B<sub>1</sub>. *Mutagenesis* 18 (2): 211-216.
57. Mullis, K. B. y F. A. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.

## N/ U

58. Nakachi, K., K. Imai, S. Hayashi, J. Watanabe y K. Kawajiri (1991). Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Research* 51: 5177-5180.
59. Nakachi, K., K. Imai, S. Hayashi y K. Kawajiri (1993). Polymorphisms of the *CYP1A1* and *Glutathione S-Transferase* genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a japanese population. *Cancer Research* 53: 2994-2999.

60. Nebert, D. W. y F. J. González (1987). P450 genes: Structure, evolution, and regulation. *Annual Review of Biochemistry* 56: 945-993.
61. Nebert, D. W. (1997). Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist?. *American Journal Human Genetics* 60: 265-271.
62. Nebert, D. W. (2000). Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenetics* 10: 279-290.
63. Newton, C. R. (1995). Mutational analysis: known mutations. En: McPherson, M. J., B. D. Hames y G. R. Taylor (eds.). PCR2: a practical approach. Oxford University Press. pp. 229-253.

#### **O/ O**

64. O' Flaherty, E. (1985). Absorption, Distribution and Elimination of toxic agents. En: Williams, P. L. y J. L. Burson (eds.). Industrial Toxicology. Van Nostrand Reinhold, New York. pp 27-58.

#### **P/ P**

65. Park, J. Y., J. E. Muscat, Q. Ren, S. P. Schantz, R. D. Harwick, J. C. Stern, V. Pike, J. P. Richie, Jr. y P. Lazarus (1997). *CYP1A1* and *GSTM1* polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 5: 791-797.
66. Pavanello, S. y E. Clonfero (2000). Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutation Research* 463: 285-308.
67. Perera, F. P. (1997). Environment and cancer: Who are susceptible?. *Science* 278: 1068-1073.
68. Philp, R. B. (2001). Ecosystems and human health: Toxicology and environmental hazards. 2 ed. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA. 328 p.

69. Rockett, J. C. (2003). The future of toxicogenomics. En: Burczynski, M. E. (eds.). An introduction to Toxicogenomics. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 299-317.
70. Rolfs, A., I. Schuller, U. Finckh y I. Weber-Rolfs (1992). PCR : clinical diagnostics and research. Springer. 271 p .
71. Ruiz, R. R. (2001). Técnicas de investigación en biología molecular. Ediciones Universidad Autónoma de Madrid, España. pp. 85-88
72. Rychlik, W. (2000). Primer selection and design for polymerase chain reaction. En: Rapley, R. (ed.). The nuclei acid protocols handbook. Totowa, New Jersey, USA. pp. 581-593.

73. Safe, S. (2001). Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis. *Toxicology Letters* 120: 1-7.
74. Saito, T., M. Egashira, K. Kiyotani, M. Fujieda, H. Yamazaki, Ch. Kiyohara, H. Kunitoh y T. Kamataki (2003). Novel Nonsynonymous polymorphisms of the *CYP1A1* gene in Japanese. *Drug Metabolism Pharmacokinetics* 18 (3): SNP20 (218)-SNP23 (221).
75. Salazar, M. A. M. (1994). Monitoreo de daño genotóxico en trabajadores de una estación de transferencia de desechos industriales y peligrosos. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 52p.
76. Serrano, C. (1995). 500 años de historia: la conquista y el mestizaje biológico en México. En: Ochoa, I. (ed.). Conquista, transculturación y mestizaje: raíz y origen de México. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp. 39-49.
77. Shields, P. G., E. D. Bowman, A. M. Harrington, V. T. Doan y A. Weston (1993). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes. *Cancer Research* 53: 3486-3492.

78. Sipes, G. y A. J. Gandolfi (1986). Biotransformation of toxicants. En: Klaassen, C.D., M.O. Amdur y J. Doull (eds.). *Toxicology: the basic science of poisons*. Macmillan Publishing Company, New York. pp. 64-98.
79. Sivaraman, L., M. P. Leatham, J. Yee, L. R. Wilkens, A. F. Lau y L. Le Marchand (1994). *CYP1A1* genetic polymorphism and *in situ* colorectal cancer. *Cancer Research* 54: 3692-3695.
80. Song, N., W. Tan, D. Xing y D. Lin (2001). *CYP1A1* polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis* 22 (1): 11-16.
81. Spurr, N. K., A. C. Gough, K. Stevenson y C. R. Wolf (1987). Msp-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15. *Nucleic Acids Research* 15 (14): 5901.

**T/ U**

82. Taioli, E., J. Ford, J. Trachman, Y. Li, R. Demopoulos y S. J. Garte (1998). Lung cancer risk and *CYP1A1* genotype in african americans. *Carcinogenesis* 19 (5) : 813-817.
83. Taioli, E., F. Crofts, J. Trachman, S. Bayo, P. Toniolo y S. J. Garte (1995). Racial differences in *CYP1A1* genotype and function. *Toxicology Letters* 77 : 357-362.
84. The International SNP Map Working Group (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409: 928-933.

**V/ U**

85. Venter, J. C. (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351.
86. Vineis. P., y T. Martone (1995). Genetic-environmental interactions and low-level exposure to carcinogens. *Epidemiology* 6 (4) : 455-457.
87. Vineis, P., N. Malats y P. Boffetta (1999). Why study metabolic susceptibility to cancer ?. En: Ryder, W. (ed.). *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publications No. 148, Lyon , France. pp. 1-3.

## **W/ U**

88. White, T. J., N. Arnheim y H. A. Erlich (1989). The polymerase chain reaction. *Trends in Genetics* 5 (6): 185-188.
89. Wormhoudt, L. W. J. N. M. Commandeur y N. P. E. Vermeulen (1999). Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes : Relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 29 (1) : 59-124.

## **Y/ U**

90. Yap, E. P. H. y McGee, O'D (1994). Detection of mutations by PCR. En : Griffin, H. G. y A. M. Griffin. (eds.). PCR Technology : Current innovations. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 107-120.

## **Z/ U**

91. Zhang, Z-Y., M. J. Fasco, L. Huang, F. P. Guengerich y L. S. Kaminsky (1996). Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1-Ile462 and – Val462 : assesment of a role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Research* 56 : 3926-3933.
92. Zhao, Z., L. Jin, Y.-X. Fu (2000). Worldwide DNA sequence variation in a 10-kilobase noncoding region on human chromosome 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (21): 11354-11358.

## **Internet/ U**

93. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>: Sitio web de citocromo P450.
94. <http://www.imm.ki.se/cypalleles>: Sitio web del comité para la nomenclatura de alelos de Citocromo P450 (CYP)humano.

95. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/get\\_html.cgi?whichHtml=overview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/get_html.cgi?whichHtml=overview): Sitio web que habla sobre polimorfismos de un sólo nucleótido del centro nacional de información biotecnológica de los Estados Unidos de América.

## ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALDH2	Aldehído-deshidrogenasa
AHH	Aril hidrocarbón hidroxilasa
AHR	Receptor de hidrocarburos aromáticos
Arnt	Receptor nuclear de translocación
ASPCR	PCR alelo-específica
BaP	Benzo(a)pireno
C	Citosina
CYP450	Citocromo P450
DMBA	Dimetilbenzantraceno
DNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EPHX	Epóxido hidrolasa
G	Guanina
GSTs	Glutación S-transferasas
Ile	Isoleucina
3-Me	3-metilcolantreno
NAT2	N-acetiltransferasa 2
NQO1	NAD(P)H-quinona-oxidoreductasa
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PON1	Paraoxonasa

RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
RNAm	Ácido ribonucleicomensajero
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
T	Timina
Taq polimerasa	Enzima polimerasa del ADN de <i>Thermus aquaticus</i>
TCDD	Dioxinas
Val	Valina
XRE	Elementos de respuesta a xenobióticos