



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO  
POLITÉCNICO NACIONAL**

**“Participación de polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo del  
benceno en la excreción del ácido *trans, trans*-mucónico en una población infantil  
ambientalmente expuesta”**

**Jiménez Mendoza Evelyn Rocío**

Directora de Tesis:  
Dra. Ma. Betzabet Quintanilla Vega



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.

## **Agradecimientos**

Las alegrías, las aspiraciones, los planes, las tristezas, los miedos, los sueños, los tropezones, las enseñanzas, las experiencias, las lágrimas, las flores, las risas, las desveladas, las dudas, los logros, los aciertos, las satisfacciones y el éxito; no valdrían la pena sin aquellas personas que me han regalado su tiempo, sus conocimientos, su cariño y su amor:

A mi familia, que no cambiaría por nada en el mundo, por su apoyo incondicional; especialmente a la mujer que más admiro, no por el hecho de ser mi mamá, sino porque me ha demostrado que no importa lo difícil de la situación por la que se esté atravesando, siempre existe un camino, una manera de salir a la superficie, superarse, seguir adelante y ser feliz.

A mis profesores de la carrera. A la Dra. Betzabet Quintanilla Vega, que confió en mí y no sólo me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio sino que me brindó su apoyo y cariño ofreciéndome oportunidades únicas. Al Dr. Marco Sánchez Guerra, por compartir sus valiosos conocimientos y experiencia conmigo, por su paciencia y por abrirme las puertas de su casa.

A mis hermanas Paola y Monserrat, con quienes he compartido mi vida y sin ellas, definitivamente yo no sería la misma. A mis amigas de la carrera: Abisay, Perla, Meetztli y Noemí, con quienes compartí momentos hermosos y únicos que recordaré por siempre. A mis amigos José y Edgar, por las alegrías en los momentos donde sólo había espacio para el cansancio y por su apoyo incondicional en los momentos difíciles. A todos mis compañeros de la carrera.

Al CONACyT por su apoyo a través del donativo #87234. Al Cinvestav por el apoyo para realizar este proyecto.

## Resumen

Uno de los principales contaminantes en zonas urbanas altamente industrializadas es el benceno, y el principal efecto tóxico por la exposición crónica a este compuesto es la leucemia mieloide aguda, por lo que representa un problema de salud pública, sobre todo para los niños quienes representan una de las poblaciones más vulnerables. Durante su metabolismo, el benceno es eliminado como ácido *trans, trans* mucónico (*t,t*-AM), el cual es considerado un buen biomarcador de exposición al benceno. Los genes de algunas de las enzimas que participan en el metabolismo del benceno, como el citocromo P450 2E1 (CYP2E1), epóxico hidrolasa (EH), NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) y glutatión-S-transferasas (GST's) presentan polimorfismos que podrían modular el metabolismo de este compuesto y por lo tanto, la excreción de sus metabolitos, incluyendo los metabolitos reactivos; de esta manera, algunos individuos serían más susceptibles a sus efectos tóxicos. El municipio de Coatzacoalcos, Ver. se caracteriza por ser un área con gran actividad industrial, donde se concentra el 80% de la actividad petroquímica del país, por lo que representa un problema de contaminación ambiental para la región. El objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de exposición al benceno en la población infantil del municipio de Coatzacoalcos y la participación de algunos polimorfismos genéticos de enzimas que lo metabolizan sobre los niveles del metabolito *t,t*-AM. Para ello, se realizó un estudio transversal en niños de 6 a 10 años de tres escuelas primarias localizadas cerca de los principales complejos industriales de este municipio. Se tomó una muestra de sangre en ayunas y se colectó la primera orina de la mañana. Se determinaron los niveles de *t,t*-AM por HPLC de fase reversa y la presencia de los polimorfismos *CYP2E1 PstI/RsaI*, *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* por PCR convencional, y *EPHX1T113H*, *EPHX1H139R* y *NQO1\*2* por PCR en tiempo real. La media geométrica de los niveles de *t,t*-AM fue de 370 (309-442) µg/g de creatinina, y el 30% de los niños presentaron niveles mayores que el índice de exposición biológica ocupacional (500 µg/g creatinina). Los resultados de la asociación de los niveles de *t,t*-AM y los genotipos estudiados mostraron que los individuos heterocigotos para el polimorfismo *EPHX1H139R* presentaron valores menores de *t,t*-AM (-40; IC -55,-19) y los individuos heterocigotos y homocigotos polimórficos para *NQO1\*2* presentaron niveles menores (-43%, IC -66, -7; y -52%, IC -72, -17, respectivamente) del metabolito *t,t*-AM. Estos resultados sugieren que los polimorfismos *EPHX1H139R* y *NQO1\*2* modulan los niveles urinarios del *t,t*-AM en niños ambientalmente expuestos al benceno. Esta asociación gen-ambiente puede contribuir a explicar las diferencias interindividuales en el metabolismo del benceno y puede participar en una mayor susceptibilidad de desarrollar los efectos tóxicos por exposición a este contaminante.

## Abreviaturas

CYP2E1	Citocromo P-450 isoforma 2E1
EH	Epóxido hidrolasa
GST's	Glutación S-transferasas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en inglés)
NQO1	NAD(P)H: quinona óxidoreductasa 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
<i>t,t</i> -AM	Acido <i>trans,trans</i> -mucónico

# Índice

	Página
1. Introducción	1
1.1. Benceno	1
1.1.1. Absorción, distribución y eliminación del benceno	1
1.1.2. Metabolismo del benceno	1
1.1.3. Marcadores de exposición al benceno	2
1.1.4. Efectos tóxicos por exposición al benceno	3
1.2. Polimorfismos genéticos de enzimas involucradas en el metabolismo del benceno	5
1.2.1. Citocromo P-450	6
1.2.1.1. Isoforma CYP2E1	6
1.2.1.2. Polimorfismos del gen <i>CYP2E1</i>	7
1.2.2. Epóxido hidrolasa microsomal	7
1.2.2.1. Polimorfismos del gen <i>EPHX1</i>	8
1.2.3. Glutatión S-Transferasas	8
1.2.3.1. Isoformas GSTM y GSTT	8
1.2.3.2. Polimorfismos de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i>	9
1.2.4. NAD(P)H: quinona oxido reductasa 1 ( <i>NQO1</i> )	9
1.2.4.1. Polimorfismo del gen <i>NQO1</i>	10
1.2.5. Relación entre los polimorfismos de genes de enzimas metabolizadoras del benceno y la excreción de <i>t,t</i> -AM	10
1.3. Generalidades de la zona de estudio	11
1.3.1. Actividad industrial en el municipio de Coatzacoalcos, Ver.	11
1.3.2. Problemática de salud en Veracruz	14
1.4. Justificación	14
1.5. Hipótesis	15
1.6. Objetivos	15
1.6.1. Objetivo General	15
1.6.2. Objetivos Particulares	15
2. Métodos	16
2.1. Diseño de estudio	16
2.2. Criterios de inclusión y exclusión	16
2.3. Cuantificación de creatinina en orina	17
2.3.1. Reactivos	17
2.3.2. Fundamento	17
2.3.3. Procedimiento	17
2.4. Determinación de los niveles del <i>t,t</i> -AM en orina	17
2.4.1. Toma y almacenamiento de muestras	18
2.4.2. Extracción de <i>t,t</i> -AM	18
2.4.2.1. Reactivos	18
2.4.2.2. Fundamento	18
2.4.2.3. Procedimiento	18
2.4.2.3.1. Acondicionamiento de las columnas	18
2.4.2.3.2. Extracción del analito	19
2.5. Extracción del ADN por el método de fenol-cloroformo	19
2.5.1. Reactivos	19
2.5.2. Toma de muestras	19
2.5.3. Fundamento	19

2.5.4. Procedimiento	20
2.6. Determinación de los polimorfismos <i>CYP2E1 RsaI/PstI</i>	20
2.6.1. Reactivos	20
2.6.2. Fundamento	21
2.6.3. Procedimiento	21
2.7. Determinación de los polimorfismos <i>GSTM1*0</i> y <i>GSTT1*0</i> por PCR convencional	21
2.7.1. Reactivos	21
2.7.2. Fundamento	22
2.7.3. Procedimiento	22
2.8. Determinación de los polimorfismos <i>EPH1T113H</i> , <i>EPH1H139R</i> y <i>NQO1*2</i>	23
2.8.1. Reactivos	23
2.8.2. Fundamento	24
2.8.3. Procedimiento	24
2.9. Análisis estadísticos	24
3. Resultados	26
3.1. Características de la población y niveles urinarios del <i>t,t</i> -AM	26
3.2. Polimorfismos genéticos	26
3.3. Niveles de <i>t,t</i> -AM y su relación con los polimorfismos de los genes <i>CYP2E1</i> , <i>EPHX1</i> , <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> y <i>NQO1</i> .	27
4. Discusión	29
4.1. Niveles de <i>t,t</i> -AM	29
4.2. Genotipificación	30
4.3. Niveles de <i>t,t</i> -AM y su relación con los polimorfismos <i>CYP2E1 PstI/RsaI</i> , <i>EPHX1T113H</i> , <i>EPHX1H139R</i> , <i>GSTM1*0</i> , <i>GSTT1*0</i> y <i>NQO1*2</i>	33
5. Conclusiones	36
6. Perspectivas	37
7. Referencias	38

## **1. Introducción**

### **1.1. Benceno**

El benceno es un líquido incoloro con un olor dulce que se evapora rápidamente en el aire, es poco soluble en agua y es altamente inflamable. El benceno proviene de fuentes naturales e industriales, siendo las fuentes antropogénicas las principales, ya que la mayor parte del benceno proviene de la vaporización de productos derivados del petróleo y de la combustión de hidrocarburos, además del humo del cigarro. Entre las fuentes naturales se encuentran las emisiones volcánicas y los incendios forestales (ATSDR, 2007). El benceno ha sido ampliamente utilizado como disolvente en industrias de productos farmacéuticos, tintas, diluyentes, pegamentos y desengrasantes; aunque debido a sus características cancerígenas, su uso ha sido restringido. Actualmente, el benceno es utilizado en industrias como refinerías y petroquímicas, donde es producido o aplicado como materia prima (Roma-Torres *et al.*, 2006).

#### **1.1.1. Absorción, distribución y eliminación del benceno**

El benceno ingresa al organismo principalmente por vía inhalatoria, aunque la exposición por vía oral y dérmica también son importantes. El porcentaje de excreción como metabolitos urinarios o como compuesto original depende de la dosis y de la vía de exposición: a bajos niveles de exposición, el benceno es rápidamente metabolizado y excretado en la orina principalmente como sus metabolitos conjugados, mientras que a altos niveles de exposición, las rutas metabólicas se saturan y una gran proporción de la dosis absorbida de benceno se elimina como el compuesto original en la exhalación de aire (ATSDR, 2007). La vida media de los metabolitos urinarios del benceno es generalmente menor a 24 h (Johnson *et al.*, 2007).

#### **1.1.2. Metabolismo del benceno**

El benceno es metabolizado principalmente en el hígado; el primer paso es una oxidación catalizada por el citocromo P450 (CYP), por la isoforma CYP2E1, para formar el óxido de benceno (OB), el cual se encuentra en equilibrio con su tautómero, el oxepin (Fig.1, reacciones 1 y 2). Numerosas rutas metabólicas están involucradas en la



transformación del OB-oxepin; la ruta principal involucra un re-arreglo no enzimático para formar el fenol (reacción 3), el cual es oxidado por el CYP2E1 para formar la hidroquinona (HQ) (reacción 4) o el catecol (CA) (reacción 5), los cuales son oxidados por las mieloperoxidasas (MPO) (reacciones 6 y 7), dando lugar a la formación de los metabolitos reactivos 1,4- y 1,2-benzoquinona (1,4 y 1,2-BQ). Esta reacción puede ser reversible vía la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1), enzima responsable de la reducción de las BQ (reacciones 8 y 9). Tanto el CA como la HQ pueden ser transformados por el CYP2E1 en 1,2,4-bencenotriol (reacciones 10 y 11). Los derivados del CA y la HQ son los principales metabolitos urinarios del benceno y algunos de los efectos más dañinos causados por la exposición al mismo se deben a éstos. Alternativamente, el OB puede ser metabolizado por la epóxido hidrolasa (EH) para formar el dihidrodiol benceno (reacción 12) y subsecuentemente la dihidrodiol deshidrogenasa (DHDD) cataliza la conversión a CA (reacción 13). Otras rutas metabólicas del OB incluyen: a) la conjugación con glutatión por las glutatión-S-transferasas (GSTs) (reacción 14) para formar el ácido S-fenilmercaptúrico (S-fm) y, b) la abertura del anillo catalizada por el hierro para formar el *trans,trans*-muconaldehído y sucesivamente la formación del ácido *trans,trans*-mucónico (*t,t*-AM) vía la catálisis de la alcohol deshidrogenasa (ADH) o la aldehído deshidrogenasa (ALDH) (reacciones 15 y 16) (ATSDR, 2007).

### 1.1.3. Marcadores de exposición al benceno

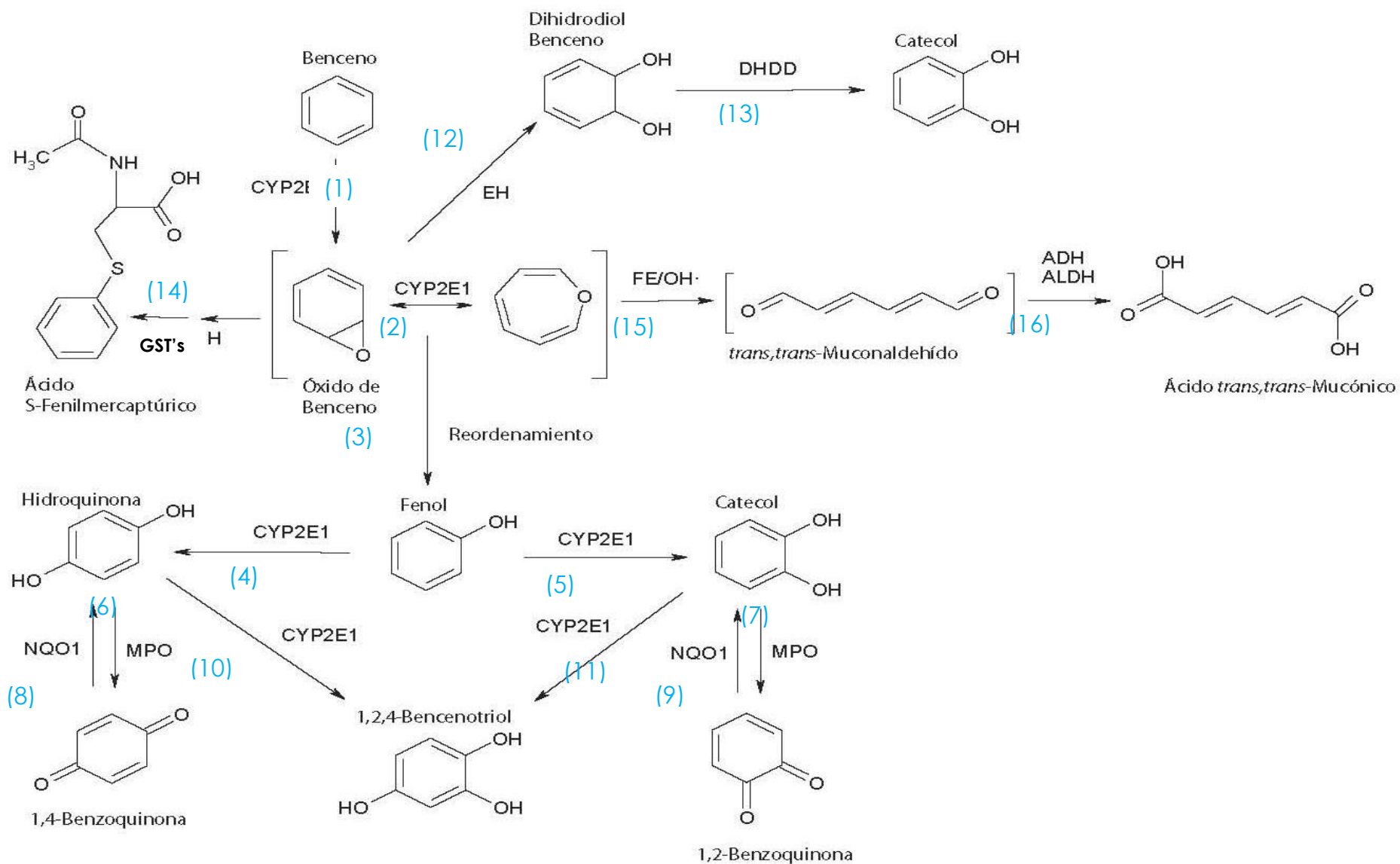
Un biomarcador de exposición es el contaminante o su metabolito, o el producto de la interacción con alguna molécula o célula blanco que pueda ser medido en algún sitio en el organismo (ATSDR, 2007). Un biomarcador de exposición ideal debe ser específico, disponible para el análisis con técnicas no invasivas, detectable en concentraciones traza y lo más importante, que se pueda relacionar cuantitativamente con el grado de exposición al xenobiótico de interés (Ong *et al.*, 1995).

La cuantificación de los metabolitos del benceno representa la principal estrategia para obtener información relacionada con su exposición (Marrubini *et al.*, 2002) y aunque varios metabolitos del benceno han sido ampliamente reconocidos y estudiados como útiles biomarcadores de exposición al mismo, se ha demostrado que

en particular el *t,t*-AM y el S-fm son marcadores sensibles de exposiciones a bajos niveles del compuesto (Qu *et al.*, 2005). Sin embargo, el *t,t*-AM es el metabolito más sensible y específico a bajos niveles de exposición y ha mostrado una mejor correlación con los niveles atmosféricos del benceno (Ong *et al.*, 1995). Aunque la formación del *t,t*-AM se da principalmente a través del metabolismo del benceno, existe una pequeña contribución del metabolismo del ácido ascórbico, un antimicótico comúnmente añadido a alimentos como margarina, mayonesa, quesos, bebidas y dulces (Protano *et al.*, 2010).

#### **1.1.4. Efectos tóxicos por exposición al benceno**

La exposición al benceno representa una amenaza para la salud humana, ya que está clasificado como un compuesto carcinógeno del grupo 1 (carcinogénico para los humanos). La principal consecuencia toxicológica de la exposición crónica al benceno es la leucemia mieloide aguda, aunque también se le ha asociado con anemia, pancitopenia y el síndrome mielodisplásico (ATSDR, 1997). Los efectos del benceno en la salud están mediados por sus metabolitos, los cuales son hematotóxicos y genotóxicos. La presencia de los metabolitos reactivos en la médula ósea hacen que el benceno sea especialmente tóxico para las células hematopoyéticas; así mismo, pueden generar aductos con el ADN e inducir aberraciones cromosómicas y micronúcleos (Dougherty *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que el benceno puede alterar la metilación del ADN e inducir cambios epigenéticos, como en el estudio realizado por Bollati *et al.* (2007) en policías de tránsito y despachadores de gasolina de Milán, Italia, en el cual se observó una hipometilación global del ADN, así como una hipo- e hipermetilación de genes específicos que podrían asociarse con procesos malignos, aunque los mecanismos por los cuales el benceno causa estas alteraciones epigenéticas no se han explorado.



**Fig.1.** Principales rutas metabólicas del benceno. ADH, alcohol deshidrogenasa; ALDH, aldehído deshidrogenasa; CYP2E1, citocromo P450 isoforma 2E1; DHDD, dihidrodiol deshidrogenasa; EH, epóxido hidrolasa; GST, glutatión S-transferasas; MPO, mieloperoxidasas; NQO1, NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (ATSDR, 2007).

La población infantil es considerada una de las más susceptibles a sufrir los efectos tóxicos del benceno, debido a diferentes factores como presentar una exposición mayor que los adultos, por sus características fisiológicas y su farmacocinética. Los niños absorben más contaminantes del entorno que los adultos, ya que tienen una tasa mayor de ventilación, además, los niños tienden a pasar más tiempo al aire libre y realizan una actividad física mayor; si la exposición a los contaminantes ambientales se da desde la infancia, el riesgo a sufrir los efectos adversos a la salud es muy alta (Protano *et al.*, 2010). Los estudios de exposición ambiental a benceno en poblaciones infantiles son escasos, sin embargo, se ha reportado que los niños que habitan cerca de fuentes emisoras de benceno (como gasolineras o talleres mecánicos) presentan un mayor riesgo a padecer leucemia (Brosselin *et al.*, 2009; Steffen *et al.*, 2004).

## **1.2. Polimorfismos de enzimas involucradas en el metabolismo del benceno**

Existe amplia evidencia de personas que presentan la misma exposición a un determinado compuesto y muestran diferentes niveles de severidad en la respuesta (Snyder, 2007). Recientemente se ha observado que existen grandes diferencias interindividuales en la actividad catalítica de varias de las enzimas que metabolizan xenobióticos, lo que puede traducirse en la diferente susceptibilidad observada hacia los efectos tóxicos de estos. Dentro de estas variaciones hay factores que pueden inhibir o inducir a las enzimas metabolizadoras de los xenobióticos, y la presencia de polimorfismos genéticos existentes en las enzimas.

Las variaciones específicas en la secuencia de un gen que alcanzan una frecuencia del 1% o más en una población son consideradas polimorfismos (Kelada *et al.*, 2003). Un polimorfismo puede no tener efecto (silencioso), pero es considerado funcional si altera la función catalítica, la estabilidad y/o los niveles de expresión de la proteína resultante. Entre los polimorfismos funcionales de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos se incluyen los polimorfismos en un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP, por sus siglas en inglés) que son mutaciones puntuales; si se dan en regiones codificantes de los genes, dan lugar a sustituciones de aminoácidos que pueden alterar la actividad catalítica, la estabilidad de la enzima y/o la especificidad por un sustrato; así mismo, existen mutaciones puntuales en regiones no codificantes que

pueden afectar los niveles de ARN mensajero (ARNm), de la proteína e incluso incrementar la actividad metabólica de ésta. De igual manera, se han encontrado deleciones de genes en los que no se alcanza a producir la enzima (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999). Debido a esto, se han realizado estudios enfocados en determinar si los polimorfismos genéticos de las enzimas involucradas en el metabolismo del benceno juegan un papel importante en la susceptibilidad de los individuos expuestos a estos compuestos.

### **1.2.1. Citocromo P-450**

La superfamilia de hemoproteínas del CYP es responsable de metabolizar a una variedad de compuestos endógenos y exógenos. Estas enzimas se localizan en el retículo endoplásmico liso y en la membrana mitocondrial. Las familias 1, 2 y 3 del CYP se encuentran entre las enzimas de fase 1 más importantes, ya que son responsables de metabolizar el 80% de los medicamentos, así como un número amplio de xenobióticos (González y Yu, 2006). Entre los CYP de mayor importancia para el metabolismo de fármacos se encuentran: el CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 y CYP2D6; mientras que las isoformas CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2E1 y CYP3A4 son las responsables de la activación de pre-carcinógenos (Ingelman-Sundberg, 2002). Para este trabajo, el CYP2E1 es de especial interés, ya que ésta es una de las principales enzimas involucradas en el metabolismo del benceno.

#### **1.2.1.1. Isoforma CYP2E1**

La isoforma CYP2E1 cataliza la oxidación de numerosos compuestos tóxicos de bajo peso molecular a metabolitos más tóxicos. Entre los sustratos del CYP2E1 se encuentran disolventes orgánicos (etanol, benceno y clorometano), nitrosaminas (*N*-nitrosodimetilamina) y fármacos (acetaminofén) (González y Yu, 2006). El CYP2E1 se expresa principalmente en el hígado, así como en tejidos extrahepáticos como el riñón, los pulmones y el cerebro. En el metabolismo del benceno, esta enzima es la responsable de la oxidación del compuesto padre para formar metabolitos intermedios como el OB, la HQ, el CA y el 1,2,4-bencenotriol (Dougherty *et al.*, 2008).

### **1.2.1.2. Polimorfismos del gen *CYP2E1***

El gen *CYP2E1* se localiza en el cromosoma 10q26.3 y se han descrito diferentes polimorfismos, sin embargo, los más estudiados son aquellos en los sitios de restricción *RsaI* y *PstI*, los cuales se ubican en la región promotora del gen y se encuentran en desequilibrio de ligamiento (Dougherty *et al.*, 2008). El polimorfismo de *RsaI* es ocasionado por el cambio de C por T en la posición -1019 corriente arriba de la secuencia flanco 5' del gen; mientras que el polimorfismo *PstI* es ocasionado por un cambio de G por C en la posición -1259 de la misma secuencia (Hayashi *et al.*, 1991). El alelo silvestre (c1) es el más común y la presencia del alelo polimórfico (c2) ha sido asociado con mayores niveles de ARNm del *CYP2E1*, tanto en el hígado como en los linfocitos de sangre periférica, así como con un incremento en la actividad de la enzima (Tang *et al.*, 2010). La frecuencia alélica para este polimorfismo en una población mexicana fue de 0.30 (Mendoza-Cantú *et al.*, 2004) y en mexicoamericanas fue de 0.16 (Wan *et al.*, 1998) (Tabla 1). Aunque en numerosos estudios se ha reportado que existe una asociación entre los polimorfismos del *CYP2E1* y la susceptibilidad a padecer diferentes tipos de cáncer, otros estudios señalan que no existe evidencia suficiente para esta asociación (Krajinovic *et al.*, 2002).

### **1.2.2. Epóxido hidrolasa microsomal**

A la fecha, se han identificado cinco EH, las cuales pueden diferenciarse en base a sus propiedades físicas y su localización en la célula (Wu *et al.*, 2007). La enzima EH microsomal, que es codificada por el gen *EPHX1*, participa en la fase I de la transformación de diversos xenobióticos (Sandberg *et al.*, 2000), y es considerada una enzima protectora, involucrada generalmente en la defensa contra numerosos oxidantes ambientales, aunque también es responsable de la activación de compuestos carcinógenos (Gresner *et al.*, 2007). En el metabolismo del benceno, la EH cataliza la transformación del OB a dihidrodiol benceno, el cual posteriormente forma CA que puede ser eliminado en la orina o puede formar los metabolitos reactivos 1,2-benzoquinona y 1,2,4-bencenotriol, por lo que la enzima es de gran interés para este trabajo.

### **1.2.2.1. Polimorfismos del gen *EPHX1***

Se han identificado dos polimorfismos en la región codificante del gen *EPHX1* con cambios importantes en la actividad enzimática: un polimorfismo en el exón 3 que resulta en la sustitución de una histidina (H) por una tirosina (Y) en la posición 113 de la secuencia de aminoácidos; el otro polimorfismo se da en el exón 4 y resulta en la sustitución de una arginina (R) por una H en la posición 139 de la secuencia de aminoácidos (Omiecinski *et al.*, 2000). El polimorfismo *EPHX1T113H* se ha asociado con una disminución (39%) de la actividad enzimática, mientras que el polimorfismo *EPHX1H139R* se asocia con un incremento del 25% en la actividad de la enzima (Hassett *et al.*, 1994). Las frecuencias alélicas reportadas para la población caucásica son de 0.22 para el polimorfismo *EPHX1H139R* y de 0.35 para el polimorfismo *EPHX1T113H* (Tabla 1) (Hassett *et al.*, 1994). Debido al importante papel que juega la EH en el metabolismo del benceno, resulta de gran importancia evaluar estos polimorfismos.

### **1.2.3. Glutación-S-transferasas**

Las GSTs conforman una superfamilia de enzimas que catalizan la desactivación de numerosos sustratos electrofílicos y juegan un papel muy importante en la fase II del metabolismo de xenobióticos (Sprenger *et al.*, 2000). Las GSTs realizan uno de los principales mecanismos por el que las células son protegidas de los efectos carcinogénicos de numerosos compuestos, tanto endógenos como exógenos, ya que conjugan los compuestos xenobióticos con el glutatión y una vez conjugados son más fáciles de eliminar en la orina o la bilis. En células humanas se han encontrado siete clases de GSTs: GSTA, GSTM, GSTP, GSTT, GSTZ, GSTS y GSTK (Josephy, 2010).

#### **1.2.3.1. Isoformas GSTM y GSTT**

Las isoformas GSTT y GSTM se encargan principalmente de la desactivación de epóxidos alifáticos; en el metabolismo del benceno se encargan de la transformación del OB al metabolito S-fm, por lo que se presume que una alteración en la expresión de los genes que las codifican da lugar a la susceptibilidad de sufrir los efectos tóxicos y carcinogénicos de los compuestos químicos (Gresner *et al.*, 2007).

### **1.2.3.2. Polimorfismos de los genes *GSTM1* y *GSTT1***

A la fecha se conocen cuatro alelos funcionales para el gen *GSTM1* y uno nulo (*GSTM1\*0*) por tener la delección del gen. Por otro lado, la clase GSTT consta de dos subunidades: GSTT1 y GSTT2, para la primera existen dos alelos funcionales y uno más que presenta actividad nula al existir una delección del gen (*GSTT1\*0*) (Lo y Ali-Osman, 2007). Cada delección se caracteriza por la ausencia de la respectiva proteína (Dirksen *et al.*, 2004). Las frecuencias alélicas reportadas en mestizos mexicanos para los polimorfismos *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* son de 0.33 y 0.12, respectivamente (Tabla 1) (Pérez-Morales, 2006).

Los polimorfismos genéticos *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* pueden estar relacionados con los efectos tóxicos por la exposición al benceno, ya que se ha visto que el genotipo nulo de *GSTM1* está asociado con un incremento en el riesgo a padecer diferentes tipos de cáncer relacionados con la exposición al humo del cigarro, mientras que el genotipo nulo de *GSTT1* ha mostrado una asociación con un incremento en el riesgo a padecer síndrome mielodisplásico (Dirksen *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que existe una asociación entre estas delecciones y los niveles de los metabolitos urinarios del benceno. Diversos estudios han demostrado que los genotipos nulos de *GSTM1* y *GSTT1* están asociados con un aumento en los niveles urinarios de *t,t*-AM (Wan *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008).

### **1.2.4. NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (NQO1)**

La NQO1 es una flavoproteína que cataliza la reducción de un intervalo amplio de sustancias. Como su nombre lo sugiere, sus sustratos preferidos son las quinonas y en el mecanismo de reducción de éstas se considera obligada la reducción de dos electrones (Ross, 2005). La NQO1 se ha asociado con la desactivación de numerosos compuestos endógenos y exógenos (Nebert *et al.*, 2002). Participa en las reacciones de fase II del metabolismo del benceno y actúa como un sistema de desintoxicación, ya que se encarga de la reducción de las benzoquinonas a dihidroquinonas, las cuales son menos tóxicas (Dougherty *et al.*, 2008).



#### **1.2.4.1. Polimorfismo del gen *NQO1***

Nebert *et al.* (2002) reportaron veintidós polimorfismos en el gen *NQO1*, sin embargo, solo existen dos polimorfismos bien caracterizados con fenotipos definidos: el *NQO1*\*2 y el *NQO1*\*3. La frecuencia alélica de *NQO1*\*3 es baja y sus consecuencias fenotípicas varían de acuerdo al sustrato. En este trabajo nos enfocamos en el polimorfismo *NQO1*\*2, el cual es un cambio de un solo nucleótido (C→T) en la posición 609 del gen, el cual codifica para un cambio de prolina a serina en la posición 187 de la secuencia de aminoácidos (Ross y Siegel, 2004). La proteína codificada con la variante *NQO1*\*2 es rápidamente degradada por el sistema ubiquitin proteosoma, reduciendo su vida media de 18 h (*NQO1*\*1/\*1) a solo 1.5 h aproximadamente, por lo que se considera que la proteína está ausente en los tejidos de individuos con el genotipo homocigoto polimórfico (Ross, 2005). El polimorfismo *NQO1*\*2 se ha asociado con un incremento en el riesgo a padecer leucemia en la infancia (Krajinovic *et al.*, 2002) y con un incremento en el riesgo a sufrir hematotoxicidad por exposición al benceno (Rothman *et al.*, 1996). La frecuencia alélica reportada para este polimorfismo en una población de mexicoamericanos es de 0.42 (Tabla 1) (Wiencke *et al.*, 1997).

#### **1.2.5. Relación entre los polimorfismos de genes de enzimas metabolizadoras del benceno y la excreción del ácido *t,t*-AM**

Se ha considerado que los genes polimórficos de las enzimas que participan en el metabolismo del benceno predisponen a algunos individuos a la toxicidad del mismo a través del metabolismo, por esta razón, se han realizado estudios para investigar los efectos de algunos polimorfismos en los niveles urinarios de los metabolitos del benceno. Kim *et al.* (2007) determinaron los efectos de algunos polimorfismos de genes de enzimas metabolizadoras del benceno en la producción de cinco metabolitos del mismo, entre ellos el *t,t*-AM, en individuos expuestos y no expuestos en la ciudad de Tianjin, China, y observaron que los individuos con el polimorfismo *NQO1*\*2 presentaron niveles de *t,t*-AM menores ( $p < 0.05$ ) que los individuos con el genotipo silvestre. De igual manera, Qu *et al.* (2005) realizaron un estudio en trabajadores expuestos para determinar la asociación entre los polimorfismos genéticos y la formación de metabolitos urinarios del benceno, sin embargo, no observaron diferencias significativas entre los niveles del *t,t*-AM y los polimorfismos *NQO1*\*2, *CYP2E1* *Rsa*I y

*GSTT1\*0*. Fustinoni *et al.* (2005) compararon los niveles urinarios de dos metabolitos del benceno (*S-fm* y *t,t-AM*) y del compuesto padre y la influencia de dos polimorfismos genéticos (*CYP2E1 RsaI* y *NQO1\*2*) sobre ellos, y observaron que los individuos que presentaron al menos un alelo del polimorfismo *CYP2E1 RsaI* tenían mayores niveles urinarios de *t,t-AM* en comparación con los individuos con el genotipo silvestre; sin embargo, no encontraron diferencias significativas con el polimorfismo *NQO1\*2*.

Además, se reportó que existe una asociación entre las delecciones de *GSTT1* y *GSTM1* y los niveles de los metabolitos urinarios del benceno; Lin *et al.* (2008) reportaron un incremento en los niveles de *S-fm* así como de *t-t-AM* en individuos que presentaron los genotipos nulos de *GSTT1* y *GSTM1* en una población de trabajadores de una fábrica de síntesis de sustancias químicas en Taiwán.

### **1.3. Generalidades de la Zona de Estudio**

El municipio de Coatzacoalcos se localiza en la zona sur del estado de Veracruz (Fig. 2), con una superficie de 471.2 km<sup>2</sup>, comprendiendo el 0.65% del territorio estatal y cuenta con 280,363 habitantes. El índice de marginación municipal del Consejo Nacional de la Población (CONAPO, 2000) indicó que el 55% de la población percibe hasta dos salarios mínimos, el 99% cuenta con servicio de drenaje y el 95% con agua entubada, lo que coloca al municipio de Coatzacoalcos en un grado de marginación muy bajo. Aproximadamente el 30% de la población del municipio corresponde a niños de 0-14 años (INEGI, 2005).

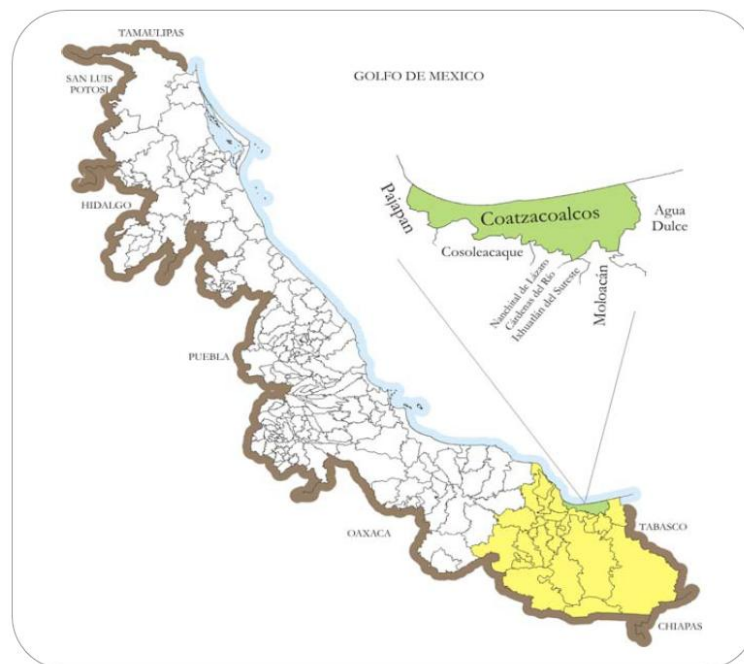
#### **1.3.1. Actividad Industrial en el municipio de Coatzacoalcos, Ver**

En el municipio de Coatzacoalcos, Ver. se han establecido diversas industrias, entre las cuales destaca la industria petroquímica secundaria. Pemex Petroquímica cuenta con 60 diferentes plantas productoras en el país y el 85% de sus productos son elaborados en la zona de Coatzacoalcos, distribuidos en los parques industriales de Cosoleacaque, Cangrejera, Morelos y Pajaritos (Bozada y Bejarano, 2006; Sánchez, 1994). Estas industrias emiten principalmente metales pesados, compuestos orgánicos volátiles y gases de efecto invernadero (SEMARNAT, 2004). Actualmente, el río Coatzacoalcos es considerado uno de los sitios más contaminados del país, debido a la

gran cantidad de mezclas de agentes tóxicos encontrados en algunos estudios ambientales y biológicos (Sánchez, 1994).

### 1.3.2. Problemática de salud en Veracruz

En México, el Sistema Nacional de Información en Salud reportó que la leucemia representó la segunda causa de mortalidad (9%) en niños de entre 5 y 14 años. De igual manera, en Veracruz, los tumores malignos (linfomas y leucemias) también representaron la segunda causa de muerte de niños en edad escolar (SINAIS, 2008). Además, el INEGI reportó que Veracruz contribuye con casi el 7% de las muertes por leucemia ocurridas en niños a nivel nacional (INEGI, 2009). Teniendo en cuenta que el principal efecto tóxico de la exposición crónica al benceno es la leucemia, resulta de gran importancia conocer el grado de exposición a benceno en la población de este municipio, sobre todo en la población infantil, ya que es una de las poblaciones más vulnerables a padecer los efectos adversos a la salud causados por la exposición a benceno.



**Fig. 2.** Municipio de Coatzacoalcos, Veracruz.

**Tabla 1. Polimorfismos de las enzimas que metabolizan al benceno.**

<b>Enzima</b>	<b>Polimorfismo (rs)</b>	<b>Efecto</b>	<b>Población/ Frecuencia</b>	<b>Referencia</b>
<b>CYP2E1</b>	<i>RsaI/PstI</i> (rs2031920/rs3813867)	Incrementa la cantidad de ARNm de <i>CYP2E1</i> y la actividad metabólica	Mexicanos/ 0.30 México-Americanos/ 0.16	Mendoza-Cantú <i>et al.</i> , 2004 Wan <i>et al.</i> , 1998
<b>EH</b>	<i>EPHX1T113H</i> (rs1051740)	Disminución de la actividad metabólica (39%)	Caucásicos/ 0.22	Hassett <i>et al.</i> , 1994
<b>EH</b>	<i>EPHX1H139R</i> (rs2234922)	Incremento de la actividad metabólica (25%)	Caucásicos/ 0.35	Hassett <i>et al.</i> , 1994
<b>GSTM</b>	<i>GSTM1*0</i>	Actividad nula	Mestizos Mexicanos/ 0.33	Pérez-Morales, 2006
<b>GSTT</b>	<i>GSTT1*0</i>	Actividad nula	Mestizos Mexicanos/ 0.12	Pérez-Morales, 2006
<b>NQO1</b>	<i>NQO1*2</i> (rs1800566)	Actividad nula por inestabilidad de la proteína	México-americanos/ 0.42	Wiencke <i>et al.</i> , 1997

CYP2E1: Citocromo P450 isoforma 2E1; EH: Epóxido hidrolasa; GST: Glutación-S-transferasa; NQO1: NAD(P)H: quinona oxidoreductasa.

#### **1.4. Justificación**

El municipio de Coatzacoalcos, Ver. es una de las zonas más contaminadas del país, ya que ahí se encuentran algunos de los complejos industriales petroquímicos más grandes de México, por lo que la población que habita en las zonas cercanas a estos complejos se encuentra continuamente expuesta a contaminantes como el benceno. Se sabe que la principal consecuencia por la exposición a este compuesto es la leucemia y se ha reportado que ésta es la segunda causa de muerte de niños en edad escolar en Veracruz. Considerando que los niños constituyen una de las poblaciones más vulnerables a sufrir los efectos tóxicos causados por la exposición al benceno y que estos efectos podrían variar por la presencia de polimorfismos genéticos de las enzimas que participan en el metabolismo de este compuesto, resulta de gran importancia conocer el grado de exposición al benceno y evaluar si la presencia de los polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras del benceno: *CYP2E1 RsaI/PstI*, *EPHX1H139R*, *EPHX1T113H*, *GSTM1\*0*, *GSTT1\*0* y *NQO1\*0* modifican los niveles del metabolito en la orina.

#### **1.5. Hipótesis**

Los niveles urinarios del metabolito del benceno, ácido *t,t*-AM, estarán modulados por la presencia de los polimorfismos genéticos *CYP2E1 RsaI/PstI*, *EPHX1H139R*, *EPHX1T113H*, *GSTM1\*0*, *GSTT1\*0* y/o *NQO1\*2*.

#### **1.6. Objetivos**

##### **1.6.1. Objetivo General**

Conocer el grado de exposición al benceno en una población infantil del municipio de Coatzacoalcos, Ver., y la participación de polimorfismos genéticos sobre los niveles del metabolito *t,t*-AM.

##### **1.6.2. Objetivos particulares**

1. Determinar el nivel de exposición al benceno mediante la cuantificación del *t,t*-AM en orina.

2. Determinar las frecuencias alélicas de los polimorfismos genéticos de las enzimas metabolizadoras del benceno: *CYP2E1 RsaI/PstI*, *EPHX1H139R*, *EPHX1T113H*, *GSTM1\*0*, *GSTT1\*0* y *NQO1\*0*.
3. Evaluar la asociación entre los niveles urinarios del *t,t*-AM y la presencia de los polimorfismos genéticos.

## 2. Métodos

### 2.1. Diseño del estudio

Se realizó un estudio de tipo transversal en una población infantil del municipio de Coatzacoalcos, Ver., invitando a participar a niños de 6 a 10 años de edad de tres escuelas primarias públicas cercanas a los principales complejos industriales (Fig. 3) Los padres o tutores que aceptaron que sus niños participaran en el estudio firmaron una carta de consentimiento informado y se les aplicó un cuestionario para obtener información acerca de las características socio-económicas, los hábitos alimenticios, la exposición a diversos contaminantes ambientales, el estado general de salud, el consumo de fármacos y el tabaquismo pasivo (humo de segunda mano).



**Fig. 3.** Sitios de Muestreo. Coatzacoalcos, Ver. Se identifican con una estrella.

### 2.2. Criterios de inclusión y exclusión

Como criterios de inclusión, que fueran niños de 6 a 10 años de edad de ambos géneros, cuyos padres o tutores aceptaran que participaran y firmaran la carta de consentimiento informado; como criterio de exclusión se tuvo que los niños tuvieran un diagnóstico de cáncer y que los padres fumaran (fumadores pasivos). Para la determinación de las frecuencias alélicas, se excluyeron al azar a aquellos individuos

con parentesco, dejando a uno por familia, para no sobrestimar la frecuencia de los polimorfismos.

### **2.3. Cuantificación de creatinina en la orina**

Para la determinación de creatinina en la orina empleamos el método colorimétrico propuesto por Jaffe (Hervey, 1953).

#### **2.3.1. Reactivos**

Se utilizó un kit comercial marca Randox (Antrim, Reino Unido).

#### **2.3.2. Fundamento**

La creatinina en solución alcalina reacciona con el ácido pícrico para formar un compuesto rojo anaranjado (reacción de Jaffé). La absorbancia de este complejo es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra.

#### **2.3.3. Procedimiento**

La orina se diluyó (1:49) con agua MiliQ. El reactivo de trabajo se preparó mezclando volúmenes iguales de las soluciones R1a y R1b contenidas en el kit. La muestra patrón se preparó adicionando 1.0 mL del reactivo de trabajo y 0.1 mL de la solución patrón y posteriormente se leyó en el espectrofotómetro Eclipse Vitalab Merck, a una longitud de onda de 490 nm.

### **2.4. Determinación de los niveles del *t,t*-MA en la orina**

La cuantificación del *t,t*-AM se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), por el método descrito por Ducos *et al.* (1992) con algunas modificaciones.

#### **2.4.1. Reactivos**

El metanol grado HPLC, ácido acético y Trizma fueron obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Las columnas SAX Strata phenomenex; de Agilent (Santa Clara, CA).



## **2.4.2. Toma y almacenamiento de la muestra**

Se colectó la primera orina de la mañana en recipientes estériles, se acidificó con ácido clorhídrico (HCl) 6 M añadiendo 100 µl por cada 10 ml de muestra colectada y se preservó a 4°C hasta su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min y se prepararon alícuotas de 3 ml que fueron preservadas a 4°C hasta su análisis.

## **2.4.3. Extracción del metabolito *t,t*-AM**

Para separar el analito de la muestra de orina se realizó una extracción empleando columnas de intercambio aniónico.

### **2.4.3.1. Fundamento**

En la cromatografía de intercambio aniónico, la retención se basa en la atracción electrostática entre los iones en solución y las cargas inmobilizadas a la fase estacionaria. Los iones de la misma carga son excluidos, mientras que los de carga opuesta son retenidos por la columna. Así, las partículas  $N^+(CH_3)$  contenidas en las columnas SAX empleadas son un intercambiador aniónico usado para la adsorción de ácidos. Las condiciones óptimas para la extracción requieren que el intercambiador iónico y el analito tengan cargas opuestas. El pH de la muestra deberá favorecer la forma ionizada del analito (dos unidades arriba del pKa), lo que favorece la completa adsorción del analito. Para la elución, debe emplearse un solvente que neutralice el ácido y compita con el analito en los sitios de intercambio.

### **2.4.3.2. Procedimiento**

#### **2.4.3.2.1. Acondicionamiento de las columnas**

Se emplearon columnas SAX 500 mg y 6 ml de Strata phenomenex (Santa Clara, CA) Las columnas se colocaron en la cámara de vacío y se les agregaron 4 ml de metanol, el solvente se dejó en contacto con las columnas durante 10 min, se aplicó vacío y se añadieron 3 ml de agua desionizada, se dejó pasar el volumen con un ligero vacío y se pasó un volumen de 2 ml de amortiguador Trisma 0.05 M.

#### **2.4.3.2.2. Extracción del analito**

A 1 ml de orina se le añadieron 2 ml del amortiguador Trisma 0.2 M y se hicieron pasar por las columnas previamente acondicionadas como se señaló anteriormente, sin emplear vacío. Se pasaron 2 ml de agua desionizada y a continuación 3 ml de ácido acético al 1%. Se aplicó vacío durante 15 min hasta que las columnas se secaron. Se eluyeron con 3 mL de ácido acético/metanol al 20% y se aplicó vacío durante 20 min. Se filtró el eluato en jeringa con un filtro de 0.45  $\mu$ m. Finalmente, se inyectaran 20  $\mu$ l en el HPLC bajo las condiciones indicadas en la Tabla 2. Se utilizó un Cromatógrafo Agilent serie 1100 equipado con una bomba cuaternaria.

### **2.5. Extracción del ADN por el método de fenol-cloroformo**

#### **2.5.1. Reactivos**

El Tris-HCl se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania), el cloruro de magnesio tetrahidratado de Mallinckrod (Phillipsburg, NJ), el cloruro de sodio, Tritón X-100 y sacarosa de Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

#### **2.5.2. Toma de las muestras**

Se realizó la colecta de una muestra de sangre en ayunas por punción venosa en tubos vacutainer con EDTA.

#### **2.5.3. Fundamento**

La extracción de ADN por la técnica de fenol-cloroformo se basa en el uso de solventes orgánicos que por diferencia de densidades y por su capacidad para degradar proteínas permiten la purificación y el aislamiento de ADN. Este procedimiento consiste en la separación de una mezcla que contiene la muestra de la que se desea obtener el ADN, una solución acuosa de fenol-cloroformo y una solución de desnaturalización que al centrifugarse dan lugar a una fase superior acuosa y a una fase inferior orgánica. Los ácidos nucleicos (ADN y ARN) se encontraran en la fase acuosa, mientras que las proteínas se encontrarán en la fase orgánica.

**Tabla 2. Condiciones cromatográficas para la cuantificación del ácido *t,t*-AM.**

<b>Detector</b>	UV-Vis (259 nm)
<b>Columna</b>	C-18 (Zorbax)
<b>Fase móvil</b>	Metanol/Ácido acético al 1% (20:80)
<b>Flujo</b>	1 ml/min
<b>°T de la Columna</b>	30°C

Equipo: Agilent serie 1100. Bomba cuaternaria

#### **2.5.4. Procedimiento**

Se colocaron 1.5 ml de sangre congelada en un tubo cónico con 13 ml de solución de lisis (pH= 7.4) y se mezclaron en vórtex. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 2000 g por 15 min (4°C) y la pastilla se resuspendió en 700 µl de amortiguador de suspensión (150 mM NaCl, 60 mM EDTA, 400 mM Tris-HCl, 1% SDS, pH 7.4) y 180 µl de perclorato de sodio 5 M; se mezclaron por rotación suave durante 15 min y se incubaron a 65°C por 30 min. Se agregaron 2 ml de cloroformo puro (-20°C) y se mezcló por rotación suave durante 10 min, se centrifugó a 1400 g por 15 min (4 °C) y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se agregaron 2 volúmenes de etanol puro (4°C) y se mezcló por inversión. A continuación se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml y se agregaron 500 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 1000 rpm por 10 min (4°C) y se quitó el sobrenadante (este procedimiento se realizó dos veces más). Finalmente, se dejó secar el botón y se resuspendió en 100 µl de agua inyectable.

#### **2.6. Determinación de los polimorfismos de CYP2E1 *Pst*I/*Rsa*I mediante PCR-RFLP**

Se realizó por la técnica de Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP, por sus siglas en inglés).

##### **2.6.1. Reactivos**

Las sondas TaqMan, así como las enzimas de restricción se obtuvieron de Gibco BRL (Rockville, MD).

### 2.6.2. Fundamento

El ADN es amplificado utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Posteriormente, las secuencias específicas en el ADN que contienen la mutación son reconocidas y cortadas por enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción). La presencia de los polimorfismos se diferencia de acuerdo a la longitud de los fragmentos de restricción digeridos por las enzimas.

### 2.6.3. Procedimiento

Se realizó mediante la técnica descrita por Hayashi *et al.* (1991). Para los sitios *RsaI/PstI*, el ADN genómico se amplificó con 20 pmoles de los oligonucleótidos (iniciador directo: 5'-CCAGTCGAGTCTACATTGTCA-3'; inverso: 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3') en solución amortiguadora de PCR (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4), 0.75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de dNTPs y 2.5U de Taq polimerasa en un volumen total de 50 µl, para obtener un fragmento de 410 pb. Las condiciones en las que se utilizó el termociclador fueron las siguientes: temperatura inicial de 94°C por 3 min y 35 ciclos de: 94°C por 30 s, 55°C por 60 s y 72°C por 30 s, después del último ciclo, la temperatura fue de 72°C por 7 min. Del amplicón obtenido, 15 µl fueron digeridos por separado a 37°C durante toda la noche con 10 U de las enzimas de restricción *PstI* y *RsaI*. La presencia de un alelo polimórfico para el sitio *PstI* se muestra por la presencia de dos fragmentos de 120 y 290 pb, mientras que el alelo silvestre para el sitio *RsaI* se muestra por dos fragmentos de 360 y 50 pb (Fig.4).

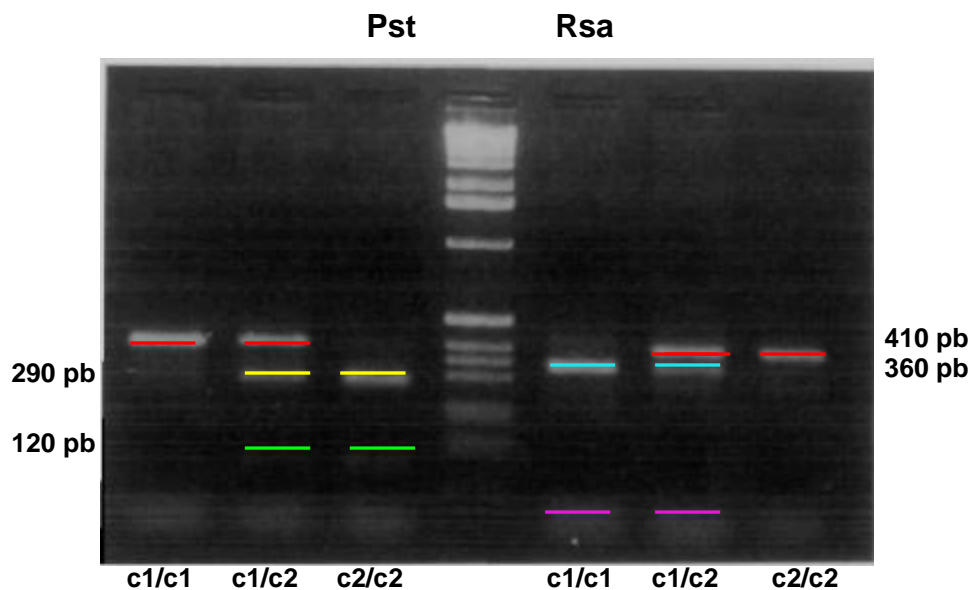
## 2.7. Determinación de los polimorfismos *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* por PCR convencional

### 2.7.1. Reactivos

Se utilizó AmpliTaq polimerasa de Gibco BRL (Rockville, MD).

### 2.7.2. Fundamento

La reacción de PCR se fundamenta en la replicación del ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí, y tras cada fase de replicación, cada hebra es replicada nuevamente. El proceso de PCR consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2 ó 3 pasos a diferentes temperaturas. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico a alta temperatura (>90°C), y al final del proceso se da un choque térmico más para la extensión del producto final.

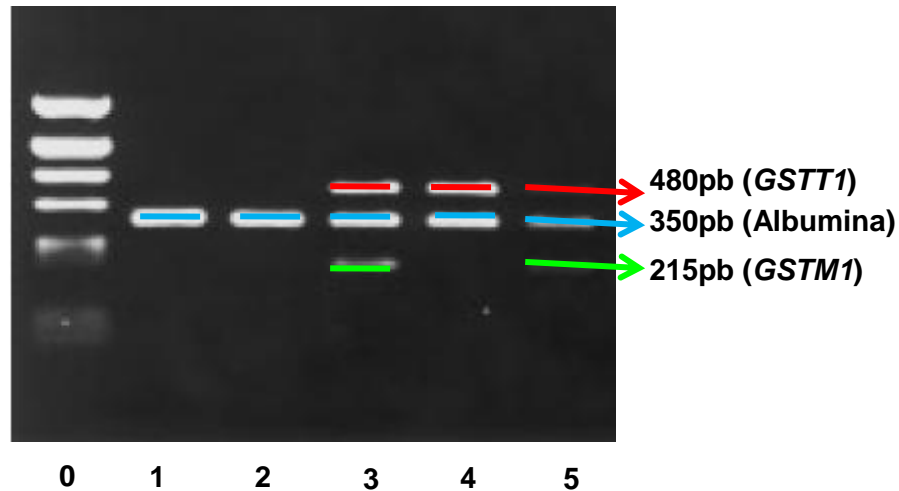


**Fig. 4.** RFLP's de los fragmentos de PCR amplificados obtenidos con las enzimas de restricción PstI y RsaI. c1/c1, homocigoto silvestre; c1/c2, heterocigoto; c2/c2 homocigoto para la variante mutada.

### 2.7.3. Procedimiento

Se realizó mediante el método descrito por Arand *et al.* (1996). Para los genes *GSTM1* y *GSTT1*, la amplificación del ADN se realizó en un volumen total de 25 µl con 5 pmoles de los oligonucleótidos de *GSTM1* y *GSTT1* (sentido: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3' y antisentido: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'; sentido: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3';

y antisentido: 5'-TCACGGGATCATGGCCAGCA-3', respectivamente) y 3 pmoles de los primers de albúmina (sentido: 5'-GCCCTCTGCTAACAAGTCCTAC-3' y antisentido: 5'-GCCCTAAAAGAAAATCGCCAATC-3') en amortiguador de PCR (50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris-HCl, pH 8.4), con 1U de AmpliTaq polimerasa. Las condiciones en las que se utilizó el termociclador fueron las siguientes: temperatura inicial de 94°C por 1 min, seguido de 40 ciclos a 94°, 60° y 72°C de 1 min cada uno, después del último ciclo la temperatura fue de 72°C por 7 min. Los fragmentos obtenidos de ADN fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa (1%) con 3 µl de bromuro de etidio. La presencia del gen se muestra por las bandas de 215 pb para *GSTM1*, 480 pb para *GSTT1* y 350 pb para la albúmina (Fig. 5).



**Fig. 5.** Amplificación de los fragmentos de PCR obtenidos para los genes *GSTM1* y *GSTT1*. Las muestras 1 y 2 representan las deleciones de *GSTM1* y *GSTT1*, las muestras 3 y 5 representan la presencia de ambos genes y la muestra 4 representa la deleción de *GSTM1*.

## 2.8. Determinación de los polimorfismos *EPHX1T113H*, *EPHX1H139R* y *NQO1\*2*

Se realizó empleando la técnica de PCR en tiempo real y sondas TaqMan específicas para cada polimorfismo.

### 2.8.1. Reactivos

Las sondas TaqMan™, así como el Master Mix para la determinación del polimorfismo se obtuvieron de Applied Biosystems (Carlsbad, CA).

### **2.8.2. Fundamento**

La técnica de PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional. Este proceso se realiza en un termociclador con capacidad de hacer incidir sobre cada muestra un haz de luz de una longitud de onda determinada y de detectar la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado: las sondas TaqMan están diseñadas para reconocer una región del ADN amplificado, y a medida que la enzima Taq polimerasa avanza sintetizando una nueva cadena, de 5' a 3', la exonucleasa degrada la sonda que ha reconocido la secuencia. Las sondas TaqMan tienen dos moléculas fluorescentes, una actúa generalmente como molécula reportera de los alelos mutantes (6-carboxifluoresceína, FAM) y la otra (VIC) como reportera de los alelos silvestres. La degradación de la sonda libera el fluoróforo y se aleja del “apagador”, permitiendo así su fluorescencia. La fluorescencia detectada en el termociclador es directamente proporcional a la del fluoróforo liberado y a la cantidad de ADN presente en la plantilla de PCR.

### **2.8.3. Procedimiento**

Las reacciones se llevaron a cabo utilizando TaqMan Universal Master Mix que incluye: la enzima AmpliTaq Golden DNA polymerase, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP, una molécula fluorescente como referencia pasiva, la mezcla de oligonucleótidos y sondas TaqMan y aproximadamente 20 ng de ADN genómico. Las condiciones a utilizar en el termociclador fueron las siguientes: temperatura inicial de 50°C por 2 min, seguido de 95°C por 10 min y 40 ciclos de: 95°C por 15 s y 60°C por 1 min. Al final de la reacción se realiza la discriminación alélica.

## **2.9. Análisis estadísticos**

Se utilizó el programa Arlequín 3.11 para evaluar la conformidad de todos los polimorfismos con la Ley de Hardy-Weinberg. Los niveles urinarios de *t,t*-AM fueron transformados al logaritmo para normalizar los residuos en el análisis de regresión posterior. La ubicación de la escuela, la edad, el sexo y el índice de masa corporal (IMC) fueron considerados como posibles factores que pueden modificar los niveles urinarios de *t,t*-AM, determinado por un análisis de regresión simple, y posteriormente

evaluando un cambio en el valor de  $\beta$  ( $\pm 10\%$ ) en el análisis de regresión múltiple; sin embargo, ninguna variable resultó confusora. Todos los análisis se realizaron con el paquete STATA v. 10.1 (Stata Corp, College Station, TX).



### 3. Resultados

#### 3.1. Características de la población y niveles urinarios de *t,t*-AM

Las características de los niños que participaron en el estudio y los niveles de *t,t*-AM se resumen en la Tabla 3. El estudio se realizó en 92 participantes, de los cuales, el 45% fueron niños y el 55% niñas. Del total de participantes en el estudio, el 59% se encontró en su peso ideal, el 10% se encontró por debajo de su peso, el 18% presentaron sobrepeso y el 13% obesidad. El valor de la media geométrica de los niveles urinarios de *t,t*-AM fue de 370 µg/g de creatinina; el 30% de los participantes presentaron niveles de *t,t*-AM superiores al índice de exposición biológica (BEI, por sus siglas en inglés) para benceno establecido para un lugar de trabajo (500 µg/g de creatinina) propuesto por la “American Conference of Governmental Industrial Hygienists” (ACGIH) en el 2006. La escuela que presentó niveles mayores de *t,t*-AM fue la que se localiza en Mundo Nuevo, aunque no se presentaron diferencias significativas entre cada una de las escuelas.

#### 3.2. Polimorfismos genéticos

Se genotipificó a los niños para seis polimorfismos de enzimas involucradas en el metabolismo del benceno, las frecuencias alélicas observadas se muestran en la Tabla 4. Se genotipificaron 72 individuos para el polimorfismo de *CYP2E1 PstI/RsaI*, de los cuales el 76% presentó el genotipo c1c1 y el 24% presentó el genotipo c1c2, para este polimorfismo no se observó el genotipo c2c2; la frecuencia alélica del polimorfismo fue de 0.12. Para el polimorfismo *EPHX1T113H*, se genotipificaron 83 individuos, de los cuales el 16% presentó el genotipo silvestre, el 51% el genotipo heterocigoto y el 33% fueron individuos homocigotos para la variante mutada; se observó una frecuencia alélica de 0.60. En el caso del polimorfismo *EPHX1H139R*, se genotipificaron 75 individuos, el 84% presentó el genotipo silvestre y el 16% tuvo el genotipo heterocigoto, ningún niño presentó el genotipo homocigoto para la variante mutada y la frecuencia alélica fue de 0.08. Para el polimorfismo *NQO1\*2*, se genotipificaron 85 niños, el 21% presentó el genotipo homocigoto silvestre, el 49% tuvo el genotipo heterocigoto y el 30% fueron homocigotos para la variante mutada; la frecuencia alélica fue de 0.54. Por otro lado, para los polimorfismos *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0*, no fue posible determinar la

proporción de individuos heterocigotos y homocigotos silvestres, ya que la técnica no permite discriminar entre uno y otro, por lo que solo se reporta la frecuencia de la deleción. Para el polimorfismo *GSTM1\*0* se genotipificaron 71 individuos y en el 22% se observó la deleción del gen, mientras que para el polimorfismo *GSTT1\*0* se genotipificaron 58 individuos, de los cuales el 17% presentó la deleción del gen. Todos los polimorfismos genéticos se encontraron en equilibrio de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg.

**Tabla 3. Características de la población.**

Característica	Valor	n (%) <sup>a</sup>
<b>Edad</b>	7.83 ± 1.23	92
<b>Género</b>	Masculino	41 (45)
	Femenino	51 (55)
<b>IMC<sup>b</sup></b>	Peso ideal	54 (59)
	Bajo peso	9 (10)
	Sobrepeso	17 (18)
	Obesidad	12 (13)
<b>Niveles de <i>t,t</i>-AM (µg/g creatinina)</b>	370 (309-442) <sup>c</sup>	
<b>Escuela:<sup>d</sup></b>		
1	362 (249-526)	
2	364 (256-519)	
3	380 (295-486)	

<sup>a</sup> Porcentaje de la población entre paréntesis. <sup>b</sup> Índice de masa corporal: calculado como el peso dividido entre la estatura elevada al cuadrado (kg/m<sup>2</sup>) y el percentil de índice de masa corporal correspondiente para la edad de acuerdo a la tabla de crecimiento de la CDC; <sup>c</sup> Media geométrica (Intervalo de confianza al 95%). <sup>d</sup> 1=Coatzacoalcos, 2= Mundo Nuevo y 3=Allende.

**Tabla 4. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados.**

Polimorfismo	Frecuencia Alélica	Genotipo			Esperado
		Homocigoto silvestre (%)	Heterocigoto (%)	Homocigoto polimórfico (%)	
<i>CYP2E1*5</i>	0.12 <sup>a</sup>	76	24		21
<i>EPHX1T113H</i>	0.60 <sup>a</sup>	16	51	33	48
<i>EPHX1H139R</i>	0.08 <sup>a</sup>	84	16		15
<i>NQO1*2</i>	0.54 <sup>a</sup>	21	49	30	50
<i>GSTM1*0</i> <sup>b</sup>				22	
<i>GSTT1*0</i> <sup>b</sup>				17	

<sup>a</sup>En equilibrio de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg; <sup>b</sup>Representa la frecuencia de la delección del gen.

### **3.3. Niveles de *t,t*-AM y su relación con los polimorfismos de los genes *CYP2E1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1* y *NQO1***

Se consideró la posibilidad de que la ubicación de la escuela, la edad, el género y el IMC fueran factores que alteraran los niveles urinarios de *t,t*-AM, por lo que se realizó una prueba estadística para corroborarlo y se observó que estas características no modifican los valores urinarios del metabolito (Tabla 5). Los polimorfismos *EPHX1H139R* y *NQO1\*2* se asociaron significativamente de manera negativa con los niveles del metabolito; los niños con el genotipo heterocigoto para el polimorfismo *EPHX1H139R* presentaron niveles 40% más bajos de *t,t*-AM (IC 95%; -55,-19) en comparación con los individuos con el genotipo silvestre. Por otro lado, para el polimorfismo *NQO1\*2*, los individuos con el genotipo heterocigoto presentaron niveles menores (43%) de *t,t*-AM (IC 95%; -66,-7) y los niños con el genotipo homocigoto para la variante mutada presentaron niveles 52% más bajos (IC 95%; -72,-17), ambos en comparación con los niños del genotipo silvestre.

**Tabla 5. Niveles urinarios de *t,t*-AM en la población estudiada de acuerdo a los diferentes genotipos.**

Polimorfismo	Genotipo	Ácido <i>t,t</i> -AM		
		MG (IC 95%) <sup>a</sup> (µg/g de creatinina)	Efecto (IC 95%) <sup>b</sup>	Valor de <i>p</i>
<b>CYP2E1 <i>PstI/RsaI</i></b>	C1C1 (55)	354 (273 , 458)	Referencia	
	C1C2 (17)	344 (235 , 504)	-3 (-36, 49)	0.904
<b>EPHX1T113H</b>	CC (11)	431 (211, 879)	Referencia	
	CT (35)	345 (261, 455)	-20 (60,57)	0.519
	TT (25)	368 (283, 480)	-14 (56,67)	0.647
<b>EPHX1H139R</b>	AA (59)	397 (317, 497)	Referencia	
	AG (10)	240 (193, 298)	-40 (-55,-19)	<b>0.001</b>
<b>NQO1*2</b>	CC (17)	609 (373, 993)	Referencia	
	CT (37)	345 (271, 438)	-43 (-66, -7)	<b>0.026</b>
	TT (19)	291 (208, 408)	-52 (-72,-17)	<b>0.008</b>
<b>GSTM1*0</b>	Presente (64)	372 (298, 465)	Referencia	
	Nulo (17)	337 (242 , 470)	-9 (-37, 31)	0.602
<b>GSTT1*0</b>	Presente (64)	354 (284, 440)	Referencia	
	Nulo (14)	376 (249, 567)	6 (-30, 62)	0.773

<sup>a</sup>Media Geométrica e intervalo de confianza del 95%. <sup>b</sup>Coefficiente de regresión presentado como la diferencia en porcentaje, de acuerdo al grupo de referencia y calculado con la formula %efecto=100(exp(β)-1), para datos categóricos en logaritmo.

## 4. Discusión

### 4.1. Niveles del metabolito *t,t*-AM

Los niveles del metabolito *t,t*-AM encontrados en este estudio (370 µg/g de creatinina, IC 95% 309-442) (Tabla 3) se pueden considerar altos, ya que el 30% de los niños que participaron en el estudio presentaron niveles superiores al índice de exposición biológica ocupacional establecido para el benceno (500 µg de *t,t*-AM/g de creatinina) por la “American Conference of Governmental Industrial Hygienists” de Estados Unidos; es decir, presentaron niveles superiores a los observados en adultos ocupacionalmente expuestos al benceno (ATSDR, 2007). Lo anterior podría ser el reflejo de la continua exposición a la emisión de los contaminantes provenientes de los complejos petroquímicos que hay en la zona. Desafortunadamente, no existe un índice establecido para personas expuestas ambientalmente al compuesto, lo que pone de manifiesto la urgente necesidad de regular el límite máximo permisible de benceno en el aire para la población en general para proteger su salud.

Los niveles del *t,t*-AM que observamos en la población estudiada son diferentes a los encontrados en otras poblaciones infantiles (Tabla 6). Protano *et al.* (2010) realizaron un estudio en niños de entre 5 y 11 años de edad de zonas rurales y urbanas de Italia y los niveles de *t,t*-AM que observaron en los niños que habitaban en zonas urbanas (114.95 µg/g de creatinina) fueron menores que los observados en este estudio en una zona petroquímica. En otro estudio realizado por Navasumrit *et al.* (2005) en Tailandia se compararon los niveles de exposición ocupacional y ambiental a benceno en diferentes grupos (niños, trabajadores de petroquímicas, trabajadores de gasolineras y vendedores ambulantes) y encontraron que los niveles urinarios de *t,t*-AM observados en los niños ( $0.17 \pm 0.03$  mg/g de creatinina) fueron mayores a los encontrados en los vendedores ambulantes y comparables con los niveles que presentaron los trabajadores de las gasolineras e industrias petroquímicas, por lo que concluyeron que probablemente los niños pueden transformar una mayor cantidad de *t,t*-AM que los adultos. En otro estudio, Weaver *et al.* (1996) evaluaron la exposición al benceno en una población infantil de Baltimore, EU, y observaron niveles mayores de *t,t*-AM (176.6 µg/g de creatinina), en comparación con los adultos no ocupacionalmente expuestos al benceno, e incluso con individuos fumadores; además, los autores señalaron que la edad puede ser un factor importante para explicar estas diferencias, ya que los niños podrían

metabolizar mayores proporciones del benceno a *t,t*-AM que los adultos. Por lo anterior, los niveles del metabolito observados en este estudio (370 µg/g de creatinina, IC 95% 309-442) sugieren que los niños de la población de Coatzacoalcos, además de transformar una mayor cantidad de *t,t*-AM, podrían estar expuestos a mayores niveles de benceno; sin embargo, para esto sería necesario realizar un monitoreo ambiental de los niveles del compuesto, lo cual nos permitiría determinar si los niveles observados se deben a la exposición o a variaciones relacionadas con la edad.

**Tabla 6. Niveles de ácido *t,t*-AM en diferentes poblaciones.**

País	Población	µg/g de creatinina	Referencia
EUA	Niños de una zona urbana	177	Weaver <i>et al.</i> , 1996
Italia	Niños de área urbana	114.95	Protano <i>et al.</i> , 2010
Tailandia	Niños	170	Navasumrit <i>et al.</i> , 2005
	Vendedores ambulantes	110	
	Trabajadores de gasolinera	180	
	Trabajadores de petroquímica	180	
México	Niños de zona petroquímica	370	Este estudio

#### 4.2. Genotipificación

En la Tabla 7 se presentan las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados en diferentes poblaciones comparadas con las frecuencias que se observaron en este estudio. La frecuencia del polimorfismo *CYP2E1 PstI/RsaI* fue baja (0.12) en comparación con poblaciones de chinos (0.25-0.50) y habitantes de la Ciudad de México y Coahuila (0.30;  $p < 0.05$ ); del mismo modo, la frecuencia del polimorfismo *EPHX1H139R* (0.08) fue menor respecto a la reportada por Hasset (1994) en una población de estadounidenses (0.35;  $p < 0.05$ ); para esta misma población, la frecuencia del polimorfismo *EPHX1T113H* fue de 0.22, que en comparación con la frecuencia obtenida en este estudio (0.60), ésta última resulta mayor ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, la frecuencia de la delección de *GSTM1* no presentó diferencias significativas al ser comparada con una población de mestizos mexicanos de la ciudad de México, así mismo, la frecuencia de *GSTT1\*0* tampoco

presentó diferencias significativas con la frecuencia observada en esa misma población; por último, la frecuencia del polimorfismo *NQO1\*2* no mostró diferencias significativas al compararlo con una población de mexicoamericanos.

**Tabla 7. Frecuencias alélicas de los polimorfismos *CYP2E1 RsaI/PstI*, *EPHX1T113H*, *EPHX1H139R*, *GSTM1\*0*, *GSTT1\*0* y *NQO1\*2* en diferentes poblaciones.**

Polimorfismo	Población	Frecuencia alélica	Referencia
<b><i>CYP2E1 RsaI/PstI</i></b>	Chinos	0.25*	Garte <i>et al.</i> , 2001
		0.50*	
	Caucásicos	0.10	Gattás y Soares-Vieira, 2000
		0.05	
	Mexicoamericanos	0.08	Raucy <i>et al.</i> , 1999
		0.10	Wu <i>et al.</i> , 1997
Mexicanos	0.30*	Mendoza-Cantú <i>et al.</i> , 2003	
	0.12	Este estudio	
<b><i>EPHX1T113H</i></b>	Estadounidenses	0.22*	Hassett <i>et al.</i> , 1994
	Mexicanos	0.60	Este estudio
<b><i>EPHX1H139R</i></b>	Estadounidenses	0.35*	Hassett <i>et al.</i> , 1994
	Mexicanos	0.08	Este estudio
<b><i>GSTM1*0</i><sup>a</sup></b>	Mestizos	0.33	Pérez-Morales <i>et al.</i> , 2008
	Mexicanos		
	Mexicanos	0.22	Este estudio
<b><i>GSTT1*0</i><sup>a</sup></b>	Mestizos	0.12	Pérez-Morales <i>et al.</i> , 2008
	Mexicanos		
	Mexicanos	0.17	Este estudio
<b><i>NQO1*2</i></b>	Mexicoamericanos	0.42	Wiencke <i>et al.</i> , 1997
	Mexicanos	0.54	Este estudio

\*Frecuencias alélicas con diferencia significativa respecto a las encontradas en este estudio ( $p < 0.05$ ). <sup>a</sup>Frecuencia de la delección del gen.

El polimorfismo *CYP2E1 PstI/RsaI* se ha asociado con un incremento en la transcripción de la enzima, la cual se encarga de la transformación del benceno en

OB, siendo el paso inicial en el metabolismo del compuesto. Los estudios realizados en poblaciones mexicanas son escasos y muestran una variabilidad alta; en trabajadores de la industria del coque en Coahuila se observó una frecuencia de 0.30 (Mendoza-Cantú *et al.*, 2003), mientras que en una población de mexicoamericanos fue de 0.16 (Wan *et al.*, 1998) y para niños mestizos del estado de Veracruz en este estudio se obtuvo una frecuencia de 0.12. Por esta razón, resulta de gran importancia e interés realizar estudios posteriores en diferentes zonas del país y así conocer la distribución del genotipo en la población mexicana.

La EH es una enzima que metaboliza epóxidos reactivos y los transforma en dihidrodioles por medio de la adición de agua, éstos son compuestos menos reactivos y fácilmente solubles (Wu *et al.*, 2007). En el metabolismo del benceno, esta enzima es responsable de la transformación del OB a dihidrodiol, que posteriormente es transformado en CA, metabolito que puede ser eliminado en la orina o que puede dar pie a la formación del metabolito reactivo 1,2-BQ (ATSDR, 2007). Los polimorfismos del gen *EPHX1* pueden incrementar o disminuir la actividad de la enzima, por lo que es de gran importancia evaluar su presencia en los individuos expuestos. En el presente estudio, el 33% de los niños presentaron el genotipo homocigoto para la variante mutada de *EPHX1T113H* (disminución en la actividad enzimática); mientras que para el polimorfismo *EPHX1H139R* (incremento en la actividad enzimática) no se presentó el genotipo homocigoto para la variante mutada en ningún individuo. Se encontró que las frecuencias alélicas de los polimorfismos *EPHX1T113H* y *EPHX1H139R* fueron de 0.60 y 0.08, respectivamente. Desafortunadamente, no existen trabajos realizados en poblaciones mexicanas con las que se puedan comparar las frecuencias observadas; sin embargo, al compararlas con las reportadas en una población de estadounidenses: 0.22 para *T113H* y 0.35 para *H139R* (Hassett *et al.*, 1994), se observó una diferencia significativa para ambos polimorfismos. La presencia del polimorfismo *EPHX1H139R*, el cual aumenta la actividad de la enzima puede llevar a una mayor formación de CA, el cual puede ser más fácilmente eliminado en la orina, por otro lado, una mayor producción de CA podría llevar a la formación del metabolito reactivo 1,2-BQ (Kim *et al.*, 2007), por lo que sería conveniente evaluar también los niveles de CA en la orina.



En este estudio se encontró una frecuencia de la delección del gen *GSTM1* de 22% que no fue diferente a la reportada por Pérez-Morales *et al.* (2008) en una población de mestizos de la Ciudad de México que fue de 33%. Por otro lado, la frecuencia de la delección del gen *GSTT1* fue de 17%, la cual no fue diferente con la reportada para otra población mestiza mexicana (12%) (Pérez-Morales *et al.*, 2008) Tanto *GSTM1* como *GSTT1* son enzimas importantes que catalizan la conjugación de diferentes compuestos de bajo peso molecular. Chen *et al.* (2007) reportaron un mayor riesgo de padecer los efectos tóxicos por exposición al benceno en una población de chinos ocupacionalmente expuestos que presentaron la delección del gen *GSTT1* en comparación con aquellos que sí lo presentaban; mientras que Dirksen *et al.* (2004) observaron que niños de Alemania y Austria que no presentan la enzima *GSTT1* poseen mayor riesgo de padecer anemia.

Finalmente, en este estudio, el genotipo homocigoto para la variante mutada de *NQO1\*2* se observó en 26 individuos, con una frecuencia alélica de 0.54, que al ser comparada con una población de mexicoamericanos (0.42) (Wiencke *et al.*, 1997) no mostró diferencia significativa. Se ha reportado que la *NQO1* actúa como un sistema de desactivación de las quinonas derivadas del metabolismo del benceno. El polimorfismo *NQO1\*2* causa una alteración a nivel de la proteína, ya que al presentarse el polimorfismo la enzima es degradada rápidamente, reduciendo su vida media de 18 a 1.5 h (Ross, 2005). Se ha demostrado que los portadores de este polimorfismo presentan un incremento en el riesgo de sufrir los efectos tóxicos causados por la exposición al benceno (Ross, 2005). Por lo anterior, se consideró de gran importancia conocer la frecuencia de este polimorfismo en la población de nuestro estudio.

#### **4.3. Niveles de *t,t*-AM y su relación con los polimorfismos *CYP2E1 PstI/RsaI*, *EPHX1T113H*, *EPHX1H139R*, *GSTM1\*0*, *GSTT1\*0* y *NQO1\*2***

El benceno es metabolizado por un sistema enzimático que incluye al *CYP2E1*, la *EPHX1*, las *GSTs* y la *NQO1*, entre otras. Los metabolitos que se forman en este proceso pueden ser excretados en la orina o reaccionar con macromoléculas en los órganos blanco (Qu *et al.*, 2005). La presencia de algunos polimorfismos puede influir en el metabolismo del benceno y la formación de sus metabolitos, modificando así los niveles urinarios de estos en los individuos, como es el caso del *t,t*-AM. Se han realizado estudios en los que se determinaron los

niveles de *t,t*-AM y se relacionaron con la presencia de los diferentes polimorfismos que evaluamos en este estudio (*CYP2E1\*5*, *EPHX1T113H*, *EPHX1H139R*, *GSTM1\*0*, *GSTT1\*0* y *NQO1\*2*) (Kim *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2005; Sørensen *et al.*, 2003); sin embargo, no se ha llegado a una conclusión acerca de qué polimorfismos modulan los niveles de *t,t*-AM y de qué manera afectan el metabolismo del benceno.

Los efectos del polimorfismo *CYP2E1 PstI/RsaI* en el metabolismo del benceno y la formación de sus metabolitos no están bien establecidos. Fustinoni *et al.* (2005) reportaron un incremento en los niveles de *t,t*-AM en los individuos heterocigotos en comparación con los individuos con el genotipo silvestre. Sin embargo, existen estudios en los que no se ha observado dicha asociación entre la excreción del metabolito y este polimorfismo (Qu *et al.*, 2005; Verdina *et al.*, 2001). La falta de asociación entre el polimorfismo *CYP2E1 PstI/RsaI* y los niveles urinarios de *t,t*-AM en este estudio, podría explicarse por la baja frecuencia del alelo c2 observado en nuestra población (0.12), por lo que resultaría importante evaluar esta asociación en una población más grande o en otra población con una frecuencia más alta.

Por otro lado, tampoco observamos una asociación entre los niveles del metabolito *t,t*-AM y la presencia del polimorfismo *EPHX1T113H*, pero sí encontramos que los individuos heterocigotos para el polimorfismo *EPHX1H139R* presentaron niveles inferiores de *t,t*-AM (-40%) con respecto a los individuos silvestres. Kim *et al.* (2007) reportaron que la presencia del polimorfismo *EPHX1H139R* incrementó los niveles de CA en trabajadores expuestos ocupacionalmente al benceno, y de igual manera, Garte *et al.* (2008) observaron que los individuos que presentaron este polimorfismo presentaban niveles mayores de dihidrodiol benceno y subsecuentemente de CA y 1,2-BQ. Se sabe que la enzima EH participa en la conversión del OB a CA, el cual posteriormente es transformado en el metabolito reactivo 1,2-BQ (ATSDR, 2007) y que el polimorfismo *EPHX1H139R* incrementa la actividad enzimática en un 25% (Hasset *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el polimorfismo *EPHX1H139R* modula los niveles urinarios de *t,t*-AM en los niños que participaron en el estudio, ya que al presentar un incremento en la actividad de esta enzima se favorece la formación del dihidrodiol benceno y CA, disminuyendo así la formación de *t,t*-AM y la eliminación del mismo.

En cuanto a las GSTs, enzimas involucradas en la ruta minoritaria del metabolismo del benceno que da lugar a la formación del S-fm, se ha observado que los polimorfismos *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* pueden influir en el metabolismo del benceno. En nuestro estudio no se observó una asociación entre los niveles del metabolito *t,t*-AM y los polimorfismos *GSTM1\*0* o *GSTT1\*0*, resultados similares fueron encontrados en otros estudios (Kim *et al.*, 2007; Verdina *et al.*, 2001); mientras que Rossi *et al.* (1999) observaron una asociación entre el polimorfismo *GSTT1\*0* y un incremento en la formación de *t,t*-AM, pero no observaron un efecto sobre la producción de S-fm. Ya que las GSTs no se encuentran directamente involucradas en la formación del *t,t*-AM, es probable que la presencia de los polimorfismos no afecten este proceso; sin embargo, se debe tomar en cuenta que el papel que juega cada enzima en el metabolismo no ha sido completamente identificado.

En la actualidad, el papel del polimorfismo *NQO1\*2* en la formación de los metabolitos del benceno no está claro; se han realizado estudios para evaluar la presencia del polimorfismo *NQO1\*2* y los niveles urinarios de *t,t*-AM y los resultados han sido contradictorios. Los resultados de nuestro estudio mostraron que tanto los individuos heterocigotos como los homocigotos para la variante *NQO1\*2* presentaron niveles inferiores del metabolito urinario *t,t*-AM (-43% y -52%, respectivamente), resultados que están de acuerdo con Kim *et al.* (2007), quienes realizaron un estudio en una población de chinos (Tianjin, China) expuesta ocupacionalmente al benceno y encontraron que el polimorfismo *NQO1\*2* afectó significativamente los niveles de todos los metabolitos del benceno, entre ellos el *t,t*-AM, presentando niveles menores los individuos homocigotos para la variante mutada en comparación con los individuos que presentaban los genotipos silvestre y heterocigoto. Por otro lado, Sørensen *et al.* (2003) reportaron que los niveles de *t,t*-AM incrementaron con la presencia del polimorfismo *NQO1\*2* en habitantes de Copenhague ambientalmente expuestos a benceno, y sugirieron que cuando la *NQO1* se encuentra en concentraciones menores (por ejemplo, por el efecto del polimorfismo) otras enzimas de desactivación actúan como las GST's que podrían llevar a un incremento en la formación del *t,t*-AM. Mientras que en otro estudio, Qu *et al.* (2005) no encontraron asociación entre los niveles del metabolito y la presencia del polimorfismo *NQO1\*2* en una población de chinos expuesta ocupacionalmente al benceno.

## 5. Conclusiones

- Los niños del municipio de Coatzacoalcos, Ver. presentaron niveles de *t,t*-AM (370 µm/g creatinina) que pueden considerarse altos, pues el 30% de ellos presentaron niveles similares a los observados en trabajadores expuestos laboralmente (500 µg/g de creatinina). De mantenerse estos niveles de exposición, su presencia podría considerarse un problema de salud pública.

- Los individuos heterocigotos para el polimorfismo *EPHX1H139R* presentaron valores significativamente menores de *t,t*-AM en la orina, así como los individuos heterocigotos y homocigotos para la variante *NQO1\*2*.

- El papel de los polimorfismos genéticos *EPHX1H139R* y *NQO1\*2* en los niveles urinarios de los metabolitos del benceno es complejo.

- No se encontró una asociación entre los polimorfismos *CYP2E1 PstI/RsaI*, *EPHX1T113H*, *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* y los niveles urinarios de *t,t*-AM.

- El polimorfismo de algunas enzimas metabolizadoras del benceno puede modular el metabolismo del mismo, modificando los niveles urinarios de sus metabolitos, en este caso el *t,t*-AM, lo que podría tener consecuencias en la susceptibilidad de desarrollar efectos tóxicos.

## **6. Perspectivas**

- Realizar la genotipificación de los genes de las enzimas que participan en el metabolismo del benceno en diferentes poblaciones del país.
- Realizar un monitoreo ambiental para determinar los niveles de benceno en el aire.
- Cuantificar los niveles de otros metabolitos del benceno como el *S*-fm, 1,2-BQ, 1,4-BQ, CA e HQ, además del *t,t*-AM.
- Evaluar la interacción entre los diferentes polimorfismos de los genes que participan en el metabolismo del benceno con su efecto en la excreción de los metabolitos del benceno, así como con los efectos tóxicos de los mismos.

## 7. Referencias

- ATSDR. Agency of Toxic Substances and Disease Registry. (2007). Toxicological 5. Profile for benzene. U. S. Department of Health and Human Services.
- Arand, M., Mühlbauer, R., Hengstler, J., Jäger, E., Fuchs, J., Winkler, L. y Oesch, F. (1996). A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the Glutathione S-Transferase GSTM1 y GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem.* 236: 184-186.
- Bollati, V., Baccarelli, A., Hou, L., Bonzini, M., Fustinoni, S., Cavallo, D., Byun, H., Jiang, J., Marineli, B., Pesatori, A.C., Bertazzi, P.A. y Yang, A.S. (2007). Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res.* 67: 876-880.
- Bozada, L.M. y Bejarano, F. (2006). Los contaminantes orgánicos persistentes en el istmo mexicano. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México. RAPAM. México, D. F. p 79.
- Brosselin, P., Rudant, J., Orsi, L., Leverger, G., Baruchel, A., Bertrand, Y., Nelken, B., Robert, A., Michel, G., Margueritte, G., Perel, Y., Mechinaud, F., Bordigoni, P., Hémon, D. y Clavel, J. (2009). Acute childhood leukemia and residence next to petrol stations and automotive repair garages: The scale study (SFCE). *Occup Environ Med.* 66: 598-606.
- Chen, Y., Li, G., Yin, S., Xu, J., Ji, Z., Xiu, X., Lui, L. y Ma, D. (2007). Genetic polymorphisms involved in toxicant-metabolizing enzymes and the risk of chronic benzene poisoning in Chinese occupationally exposed populations. *Xenobiotica.* 37:103-112.
- CONAPO. (2000). Consejo Nacional de Población. Índices de Marginación 2000. Disponible en: <http://www.conapo.gob.mx/00cifras/2000.htm>
- Dirksen, U., Moghadam, K.A., Mambetova, C., Esser, C., Führer, M. y Burdach, S. (2004). Glutathione S-transferase theta 1 gene (GSTT1) null genotype is associated with an increased risk for acquired aplastic anemia in children. *Pediatric Res.* 55:466-471.
- Dougherty, D., Garte, S., Barchowsky, A., Zmuda, J. y Taioli, E. (2008). NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure- A literature review. *Toxicol Lett.* 182:7-17.
- Ducos, P., Gaudin, R., Bel, J., Maire, C., Francin, J.M. y Robert, A. (1992). *Trans,trans*-muconic acid, a reliable biological indicator for the detection of individual benzene exposure down to the mg/L level. *Int Arch Occup Environ Health.* 64:309-313

- Fustinoni, S., Consonni, D., Campo, L., Buratti, M., Colombi, A., Pesatori, A.C., Bonzini, M., Bertazzi, P.A., Foà, V., Garte, S., Farmer, P.B., Levy, L.S., Pala, M., Valerio, F., Fontana, V., Desideri, A., y Merlo, D.F. (2005). Monitoring low benzene exposure: Comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 14:2237-2244.
- Garte, S., Taioli, E., Popov, T., Bolognesi, C., Farmer, P. y Merlo, F. (2008). Genetic susceptibility to benzene toxicity in humans. *J Toxicol Environ Health*. 71: 1482-1489.
- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A-K., Ambrosone, C. y Autrup, H. (2001). Metabolic Gene Polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent*. 10:1239-1248.
- Gattás, G.J.F. y Soares-Vieira, J.A. (2000). Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase mu polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occup. Med*. 50:508-511.
- González, F.J. y Yu, A. (2006). Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 46:41-64.
- Gresner, P., Gromadzinska, J. y Wasowicz, W. (2007). Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer*. 57:1-25.
- Hayashi, S., Watanabe, J. y Kawajiri, K. (1991). Genetic polymorphisms in the 5'-Flankin región change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J Biochem*. 110:559-565.
- Hassett, C., Aicher, L., Sidhu, J.S. y Omiecinski C.J. (1994). Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum Mol Genet*. 3:421-428.
- Hervey, G.R. (1953). Determination of Creatinine by the Jaffé Reaction, *Nature*. 171: 1125.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2005). Principales resultados por localidad 2005 (ITER), Veracruz de Ignacio de la Llave. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/conteo2005/localidad/iter/default.asp>
- Ingelman-Sundberg, M. (2002). Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicol*. 181-182:447-452.
- Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. y McLellan, R.A. (1999). Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends in Pharmacol Sciences*. 20:342-348.

- Johnson, E.S., Langard, S. y Lin, Y. (2007). A critique of benzene exposure in the general population. *Science Total Environ.* 374:183-198.
- Josephy, P.D. (2010). Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology. *Hum Genomics Proteomics.* 2010:1-14
- Kim, S., Lan, Q., Waidyanatha, S., Chanock, S., Johnson, B.A., Vermeulen, R., Smith, M.T., Zhang, L., Li, G., Shen, M., Yin, S., Rothman, N. y Rappaport, S.M. (2007). Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide range of air concentrations. *Pharmacogen Genomics.* 17:789-800.
- Kim, S., Vermeulen, R., Waidyanatha, S., Johnson, B.A., Lan, Q., Rothman, N., Smith, M.T., Zhang, L., Li, G., Shen, M., Yin, S. y Rappaport, S.M. (2006). Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogen.* 27:772-781.
- Krajcinovic, M., Sinnett, H., Richer, C., Labuda, D. y Sinnett, D. (2002). Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer.* 97:230-236.
- Lin, L., Chen, W., Chiung, Y., Shih, T. y Liao, P. (2008). Association between GST genetic polymorphism and dose-related production of urinary benzene metabolite markers, *trans,trans*-muconic acid and S-phenylmercapturic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17:1460-1469.
- Lo, H y Ali-Osman. (2007). Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance. *Curr Opin Pharmacol.* 7:367-374.
- Marrubini, G., Coccini, T., Maestri, L. y Manzo, L. (2002). Effect of scorbic acid administration on urinary *trans, trans*-muconic acid excretion in rats exposed to low levels of benzene. *Food Chem Toxicol.* 40:1799-1806.
- Mendoza-Cantú, A. (2003). Fenotipo y genotipo del citocromo P450 2E1 en una población ocupacionalmente expuesta a compuestos orgánicos volátiles. Tesis de Doctorado. Sección Externa de Toxicología. CINVESTAV-IPN. México.
- Mendoza-Cantú, A., Castorena-Torres, F., Bermudez, M., Martínez-Hernández, R., Ortega, A., Salinas, J.E. y Albores, A. (2004). Genotype and allele frequencies of polymorphic cytochromes P450 CYP1A2 and CYP2E1 in Mexicans. *Cell Biochem. Funct.* 22:29-34.
- Navasumrit, P., Chanvaivit, S., Intarasunanont, P., Arayasiri, M., Lauhareungpanya, N., Parnlob, V., Settachan, D. y Ruchirawat, M. (2005). Environmental and occupational exposure in Thailand. *Chem-Biol Int.* 153-154:75-83.



- Nebert, D.W., Roe, A. L. Vandale, S.E., Bingham, E. y Oakley, G.G. (2002). NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: A Huge Review. *Gen Med.* 4:62-70.
- Omiecinski, C.J., Hasset, C. y Hosagrahara, V. (2000). Epoxide Hydrolase - Polymorphism and role in toxicology. *Toxicol. Lett.* 112-113:365-370.
- Ong, C.N., Kok, P.W., Lee, B.L., Shi, C.Y., Ong, H. Y., Chia, K.S., Lee, C.S. y Luo, X.W. (1995). Evaluation of biomarkers for occupational exposure to benzene. *Occup Environ Med.* 52:528-533.
- Pérez-Morales, R., Castro-Hernández, C., Gonsebatt, M. y Rubio, J. (2008). Polymorphism of CYP1A1\*2C, GSTM1\*0 and GSTT1\*0 in a Mexican Mestizo Population: A similitude análisis. *Hum Biol.* 80: 457-465.
- Pérez-Morales, R. (2006). Frecuencia del polimorfismo CYP1A1\*2C y GSTM1\*0 en población mexicana y su posible asociación con la susceptibilidad a padecer cáncer de pulmón. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- Protano, C., Guidotti, M., Manini, P., Petyx, M., La Torre, G. y Vitali, M. (2010). Benzene exposure in childhood: Role of living environments and assessment of available tools. *Environ Int.* 36:779-787.
- Qu, Q., Shore, R., Li, G., Su, L., Jin, X., Melikian, A.A., Roy, N., Chen, L.C., Wirgin, I., Cohen, B., Yin, S., Li, Y. y Mu, R. (2005). Biomarkers of benzene: Urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem-Biol Int.* 153-54:85-95.
- Raucy J.L., Schultz, E.D., Kearins, M.C., Arora, S., Johnston, D.E., Omdahl, J.L., Eckmann, L. y Carpenter, S.P. (1999). CYP2E1 expression in human lymphocytes from various ethnic populations. *Alcoholism: Clinical and Exp Res.* 23:1868-1874.
- Roma-Torres, J., Texeira, J.P., Silva, S., Laffon, B., Cunha, L.M., Mendez, J. y Mayan, O. (2006). Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutat Res.* 604:19-27.
- Ross, D. (2005). Functions and distribution of NQO1 in human bone marrow: Potential clues to benzene toxicity. *Chem-Biol Int.* 153-154:137-146.
- Ross, D. y Siegel, D. (2004). NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1, DT-Diaphorase), Functions and Pharmacogenetics. *Meth Enzymol.* 382: 115-144.
- Rossi, A.M., Guarnieri, C., Rovesti, S., Gobba, F., Ghittori, S., Vivoli, G. y Varale, R. (1999). Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogen.* 9:445-451.
- Rothman, N., Li, G., Dosemeci, M., Bechtold, M.D., Marti, G.E., Wang, Y., Linet, M., Xi, L., Lu, W., Smith, M.T., Titenko-Holland, N., Zhang, L., Blot, W., Yin, S. y Hayes,

R.B. (1996). Hematotoxicity among Chinese workers heavily exposed to benzene. *Am J Ind Med.* 29:236-26.

- Sánchez, G. (1994). Evaluación de riesgo en salud por exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos en la población de Coatzacoalcos Veracruz. Tesis de maestría. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, México.
- Sandberg, M., Hasset, C., Adman, T.E., Meijer, J. y Omicinski, C.J. (2000). Identification and functional characterization of human soluble epoxide hydrolase genetic polymorphisms. *J Biol Chem.* 275:28873-28881.
- SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2004). Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes (RETC). <http://app1.semarnat.gob.mx/retc/index.php>
- SINAIS. Sistema Nacional de Información en Salud. (2008). Disponible en:[http://www.sinais.salud.gob.mx/buscador.html?cx=004185342586720065268%3A pznngpsaate&cof=FORID%3A11&q=mortalidad+infantil&buscar=+](http://www.sinais.salud.gob.mx/buscador.html?cx=004185342586720065268%3A pznngpsaate&cof=FORID%3A11&q=mortalidad+infantil&buscar=)
- Snyder, R. (2007). Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies by HA Khan. *Hum Exp Toxicol.* 26:687-696.
- Sørensen, M., Skov, H., Autrup, H., Hertel, O. y Loft, S. (2003). Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *Science Total Environ.* 309:69-80.
- Sprenger, R., Schlagenhauer, R., Kerb, R., Bruhn, C., Brockmöller, J., Roots, I. y Brinkmann, U. (2000). Characterization of the glutathione S-transferase *GSTT1* deletion: discrimination of all genotypes by polymerase chain reaction indicates a trimodular genotype-phenotype correlation. *Pharmacogen.* 10:557-565.
- Steffen, C., Auclerc, M.F., Auvringnon, A., Baruchel, A., Kebaili, K., Lambilliotte, A., Leverger, G., Sommelet, D., Hémon, D. y Clavel, J. (2004). Acute childhood leukemia and environmental exposure to potential sources of benzene and other hydrocarbons; a case-control study. *Occup Environ Med.* 61: 773-778.
- Tang, K., Li, Y., Zhang, Z., Gu, Y., Xiong, Y., Feng, G., He, L. y Qin, S. (2010). The PstI/RsaI and DraI polymorphisms of CYP2E1 and head and neck cancer risk: a meta-analysis based on 21 case-control studies. *BMC Cancer.* 10:575-582.
- Verdina, A., Galati, R., Falasca, G., Ghittori, S., Imbriani, M., Tomei, F., Marcellini, V., Zijno, A., Del Vecchio, V. y Crebelli, R. (2001). Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J Toxicol Environ Health.* 64: 607-618.

- Wan, J., Shi, J., Hui, L., Wu, D., Jin, X., Zhao, N., Huang, W., Xia, Z., Hu, G. (1998). Associations of genetic polymorphisms in CYP2E, MPO, NQO1, GSTM1 and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Environ Health Perspect.* 110:1213-1218.
- Weaver, V.M., Davoli, C.T., Heller, P., Fitzwilliam, A., Peters, H.L., Sunyer, J., Murphy, S.E., Goldstein, G.W. y Groopman, J.D. (1996). Benzene exposure, assessed by urinary *trans, trans*-muconic acid, in urban children with elevated blood lead levels. *Environ Health Perspect.* 104:318-323.
- Wiencke, J.K., Spitz, M., McMillan, A. y Kelsey, K.T. (1997). Lung Cancer in Mexican-Americans and African-Americans Is Associated with the Wild-Type Genotype of the NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase Polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 6:87-92.
- Wu, T., Hu, Y., Chen, C., Yang, F., Li, Z., Fang, Z., Wang, L. y Chen, D. (2007). Passive smoking metabolic gene polymorphisms and infant birth weight in a prospective cohort study of Chinese women. *Am J Epidemiol.* 166:313-322.
- Wu, X., Shi, H., Jiang, H., Kemp, B., Hong, W.K., Delclos, G.L. y Spitz, M.R. (1997). Associations between cytochrome *P4502E1* genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogen.* 18:967-973.