

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA.

“ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS GENETICOS

DEL

*GEN CYP1A1 EN LA POBLACIÓN MESTIZA E INDÍGENA DE
MÉXICO”*

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS.

"BIOLOGIA EXPERIMENTAL"

P R E S E N T A

JOSE MANUEL FRAGOSO LONA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. GILBERTO VARGAS ALARCON.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVO ACABO EN EL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA MOLECULAR EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHAVEZ", CON COLABORACION DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGIA Y REUMATOLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y DELA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRÁN" y EL DEPARTAMENTO DE INMUNOGENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR EN LA UNIDAD DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

GRACIAS A:

TUTOR: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN.

COTUTORES: DR. JULIO GRANADOS ARRIOLA

DRA. ANNIE PARDO SEMO

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TEGNOLOGIA (CONACYT) POR LA BECA OTORGADA DURANTE EL ESTUDIO Y DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLOGICAS.

DEL PRESENTE TRABAJO SE PUBLICO UN ARTICULO EN REVISTA INTERNACIONAL Y UN CONGRESO.

PUBLICACION:

[Fragoso JM, Juarez-Cedillo T, Hernandez-Pacheco G, Ramirez E, Zuniga J, Izaguirre R, de la Pena A, Granados J, Vargas-Alarcon G.](#) Cytochrome 4501A1 polymorphisms in the Amerindian and Mestizo populations of Mexico. Cell Biochem Funct. 2005 May-Jun;23(3):189-93.

CONGRESO:

Hernández-Pacheco G, **Fragoso José Manuel**, Rodríguez-Perez José Manuel, Juárez-Cedillo Teresa, Pérez-Hernández Nonanzit, Murguía-Favela Luis Enrique, Pérez-Vielma Nadia, Martínez-Rodríguez Nancy, Vargas-Alarcón Gilberto. Polimorfismo del citocromo P4501A1 en población amerindia y mestiza de México. I congreso Nacional de Medicina Genómica. México D.F. Agosto 2005

Quiero dedicar este trabajo a todas aquellas personas que siempre me apoyaron incondicionalmente durante mi formación tanto personal como académica.

A mis padres:

Dedicada a mi madre *t* y a mi padre *t* que Dios los tenga en su gloria. Gracias por el apoyo que me brindaron en vida, así como la educación que me inculcaron para ser mejor cada día.

A mi familia:

Con mucho amor y cariño a mi esposa Marycarmen Espinosa R. por todo su apoyo y comprensión que me brindo durante este difícil pero satisfactorio camino del conocimiento, que recompensare toda la vida.

A mi hijo Guillermo Fragoso E. por ser la felicidad de mi hogar y la razón de mi vida y quien es mi inspiración para salir adelante a cada paso que doy.

A mis suegros:

Guillermo Granados V. y M^a de Jesús Reyes. Que siempre me brindan su apoyo incondicionalmente.

Gracias, al Doctor Gilberto Vargas Alarcón por todo su apoyo, confianza y comprensión que me brinda a cada paso que doy, algo que siempre agradeceré durante toda la vida. También doy gracias por dejarme trabajar en su laboratorio y brindarme el apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Gracias, a mi amigo Julián Ramírez B, que siempre me apoya en todo incondicionalmente, Así mismo doy gracias a todos los compañeros del laboratorio de Biología Molecular que de una o otra manera me brindaron su apoyo.

INDICE GENERAL.

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
I. INTRODUCCIÓN	
1. Citocromo P450.....	9
◆ I.2 Familias del CYP P450 en Humano.....	11
◆ I.3 Características del CYP P450.....	13
2. Familia CYP1A	14
• 2.1 Citocromo P4501A1 (CYP1A1).....	15
• 2.2 Mecanismo del procesamiento de desintoxicación.....	16
• 2.3 Genética del CYP1A1.....	20
• 2.4 Estudios poblacionales del gen CYP1A1.....	21
• 2.5 Enfermedades Relacionadas con el Polimorfismo de CYP1A1.....	22
3. Migración.....	23
• 3.1 Poblaciones Indígenas de México.....	25
◆ 3.2 Identidad Indígena.....	27
◆ 3.3 Lenguas Indígenas.....	29
A) Indígenas Mayos.....	31
◆ a) Ubicación General.....	31
◆ b) Antecedentes Históricos.....	32
◆ c) Ubicación y Medio Ambiente.....	34
◆ d) Demografía.....	35
B) Indígenas Teenek.....	37

♦ a) Ubicación General.....	37
♦ b) Antecedentes Históricos.....	38
♦ c) Demografía.....	40
II. OBJETIVOS.....	42
a) Objetivo General.....	42
b) Objetivos Particulares.....	42
III. MÉTODOS.....	43
A) Tamaño de la Muestra.....	44
B) Extracción del DNA genómico.....	44
C) La determinación del sitio polimórfico A4889G Exon7.....	45
D) La determinación del sitio polimórfico T6235C	46
E) Análisis Estadístico.....	48
IV. RESULTADOS.....	49
V. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	53
VI. REFERENCIASBIBILOGRAFICAS.....	56
VII.ANEXOS.....	66

RESUMEN.

El gen CYP1A1 pertenece a la superfamilia del citocromo p450 que codifica para una enzima de fase I. El CYP1A1 juega un papel importante en la biotransformación metabólica de muchas sustancias químicas orgánicas y de origen xenobiotico. Participa principalmente en la biotransformación de procarcinógenos como el benzo (a) pireno y otros policíclicos aromáticos de hidrocarbano (PAH) constituyentes del humo de cigarro. El gen CYP1A1 humano presenta dos sitios polimorficos localizados en las posiciones A4889G y T6235C, los cuales se han asociado con la susceptibilidad genética a varios tipos de cáncer. La primera posición es localizada en la region 3' no codificante (T6235C), en la cual la presencia de C (alelo *m2) en esta posición se asocia con la susceptibilidad genética a cáncer de pulmón. La segunda posición (A4889G) en el codón 462 localizada en el exón 7, tiene efecto en la estructura de la proteína ya que se localiza en la region que codifica para el sitio de unión al grupo hemo. En este caso la presencia de la base "A" genera el aminoácido isoleucina, mientras que la base "G" genera valina. La presencia de G (alelo *Val) en esta posición se asocia con susceptibilidad genética a cáncer de pulmón y a enfermedades como diabetes, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis. Varios reportes demuestran una gran diferencia en la distribución de estos polimorfismos en distintos grupos étnicos. Los alelos menos comunes (*m2 y *Val) son más frecuentes en individuos asiáticos que en caucásicos y africanos. Sin embargo, resultados en poblaciones amerindias de Chile y Brasil reportan elevadas frecuencias de los alelos *m2 y *Val. Por lo tanto, considerando el importante papel que tiene estos polimorfismos en la

susceptibilidad a cáncer y la elevada variabilidad de estas frecuencias alelicas en diferentes grupos étnicos, el presente estudio analiza las frecuencias de estos marcadores en población mestiza y amerindia de México. El estudio incluyó a 212 individuos sanos no relacionados (106 mestizos mexicanos, 52 indígenas Teenek y 54 indígenas Mayos). La comparación entre las poblaciones mexicanas mostró incremento de la frecuencia génica del alelo *Ile (A en la posición 4889) en los mestizos mexicanos cuando se compara con los grupos Amerindios de México ($p < 0.05$). En el análisis de la posición T6235C se observa incremento en la frecuencia génica del alelo *m2 en indígenas Teenek cuando se compara con mestizos e indígenas Mayos ($p < 0.05$). El genotipo *m2/*m2 también se encontró incrementado en indígenas Teenek cuando se compara con mestizos ($p < 0.05$). Cuando se compararon los grupos amerindios de México con otros grupos amerindios de Sudamérica se observa que presentan elevadas frecuencias de los alelos *Val en la posición 4889 y del alelo *m2 en la posición 6235. El presente estudio por tanto corrobora las frecuencias elevadas de los alelos *Val y *m2 en las poblaciones amerindias del continente Americano. Sin embargo, se detectaron diferencias entre las poblaciones amerindias de México que se correlacionan con el tronco lingüístico del cual dependen. Por lo que los datos obtenidos ayudaran a clarificar la distribución de estos polimorfismos, así como el papel que tienen estos como marcadores genéticos y evolutivos en las poblaciones amerindias de México.

ABSTRACT

Several polymorphisms in the CYP1A1 locus have been identified and their genotypes appear to exhibit population frequencies that depend on ethnicity. We studied two CYP1A1 polymorphic sites (position 4889 and 6235) in a group of 212 unrelated healthy individuals belonging to three different Mexican populations (106 Mexican Mestizos, 52 Teenek and 54 Mayos). Comparison among Mexican populations showed increased frequency of *Ile allele (A on position 4889) in Mexican Mestizos when compared to Amerindians ($pC<0.05$). The analysis on position 6235 showed increased frequencies of *m2 (C on this position) allele in Teenek when compared to Mestizos and Mayos ($pC<0.05$) and of *m2/*m2 genotype when compared to Mestizos ($pC<0.05$). Amerindian populations (from Mexico and South America) presented the lowest frequencies of *Ile (position 4889) and *m1 (position 6235) alleles, however these frequencies vary according to the ethnic group studied. Mexican Amerindian groups together with other South Amerindian populations showed the highest frequencies for *Val at position 4889 and *m2 allele at position 6235. The present study corroborate the high frequencies of *Val and *m2 alleles in the Amerindian populations and detect some differences between Mexican populations that correlate with linguistic differences. Our data could be helpful to understand the distribution of these polymorphisms and its role as genetic and evolutive markers in the Amerindian populations.

I. INTRODUCCION.

1.- Citocromo P450

Los citocromos P450 (CYP P450) son considerados por su función como un ciclo de reacciones de monooxigenación que tienen efecto sobre compuestos orgánicos con consecuencias en la salud. Los polimorfismos genéticos de los P450 metabolizadores de drogas son determinados comúnmente por diferencias interindividuales de acuerdo al efecto terapéutico y tóxico de las drogas. La biotransformación de fármacos por las enzimas CYP P450 es la mayor determinante para la respuesta terapéutica y tóxica a una gran variedad de medicamentos de importancia clínica¹. La forma en que el organismo humano responde al consumo de sustancias químicas presenta una gran variación interindividual, debido en parte a variaciones en el metabolismo. Algunas de estas variaciones son consecuencia de diferentes polimorfismos en ciertos genes que provocan que las correspondientes proteínas que presentan diferentes niveles de actividad que se reflejan en variantes tanto de K_m , V_{max} ².

La biotransformación en general de muchos compuestos químicos ajenos al organismo y endógenos, fármacos y xenobióticos se divide en dos grandes grupos, los de Fase I que alteran químicamente a la estructura de la droga por oxidación, reducción y/o hidrólisis y las de Fase II que conjugan por glucoronidación, sulfación o acetilación, a la molécula alterada por las de fase I para su excreción por vía fisiológica³.

Una de las principales enzimas implicadas en el metabolismo y degradación de xenobioticos en mamíferos es el citocromo P450 (CYP P450) considerado un biotransformador de Fase I. Constituyen una gran familia enzimática de oxidasas que están involucradas en el metabolismo oxidativo de compuestos químicos.

Estas enzimas catalizan por reacciones de monooxigenación a cientos de moléculas orgánicas con consecuencias críticas en la salud y el funcionamiento del organismo como: esteroides, ácidos grasos, lípidos, hidroperóxidos, vitaminas liposolubles (A y D). Participan también en el metabolismo de xenobióticos entre los que se encuentran diversos fármacos, alcohol, carcinógenos, antioxidantes, solventes orgánicos, pesticidas, y alcaloides entre otros ⁴⁻¹⁰.

Los citocromos P450 están altamente distribuidos en animales, plantas, y protistas¹¹, existen en la naturaleza desde antes de la división entre organismos eucariotas y protistas¹². Se identificó en 1958 como un pigmento celular reducido y unido a membrana con un pico de absorbancia inusual a los 450 nm ^{13,14}. Posteriormente, en 1964 se sugiere el nombre de Citocromo P450 por Omura y Sato ^{15,16}, nombre con el cual se conoce actualmente. Coon MJ y colaboradores describen 28 familias de las cuales 11 son de mamífero, sin embargo con el paso de los años se lograron identificar 16 que varían en su secuencia en un 10% entre microorganismos, plantas y animales. ^{5, 17,18}.

1.2. Familias del CYP P450 en Humano.

El citocromo P450 está constituido por 16 familias, que comprenden a su vez 26 subfamilias. De estas últimas solo 20 se han identificado claramente, aunque en los últimos años aproximadamente 1000 genes de diferentes P450s se han clonado, secuenciado, expresado e identificado en el genoma humano tabla 1^{17, 18}.

Tabla 1. Familias del citocromo P450.

<i>Familia</i>	<i>Función metabólica</i>	<i>Familia</i>	<i>Función metabólica</i>
CYP1 A y B	Desintoxicación de policíclicos aromáticos de hidrocarbano	CYP 51	Biosíntesis de colesterol.
CYP 2 A-H	Desintoxicación de drogas, esteroides y antibióticos	CYP 40	Síntesis de vitamina D3- 1 α hidroxilasa
CYP 3 A	Desintoxicación de drogas, antibióticos y flavonoides.	CYP 27	Síntesis de ácidos biliares.
CYP 4	Desintoxicación de ácidos grasos y ω - oxidación	CYP 26	Síntesis de la acido retinoico hidroxilasa.
CYP 5	Desintoxicación de tromboxanos	CYP 24	Degradación de la vitamina D
CYP7 A	Desintoxicación de ácidos biliares y de la 7 α -hidroxilasa	CYP 21	Síntesis de la progesterona 21-hidroxilasa
CYP8 A y B	Desintoxicación de ácidos biliares y prostaciclín sintetasa.	CYP19	Biosíntesis de estrógeno
CYP11A y B	Desintoxicación de aldosterona y separación de la cadena de colesterol	CYP17	Síntesis de la esteroide 17 α -hidroxilasa y la esteroide C17/21 liasa.

(Tomado de Hasler, J A et al. 1999)

Los CYPs mas investigados, clonados y secuenciados presentes en humano y los sustratos sobre los cuales actúan se han encontrado en diversos órganos, glándulas y tejidos, pudiendo destacar entre estos riñón¹⁹, cerebro²⁰, testículo²¹, mucosa intestinal²², membrana nasal²³, garganta^{24,25} e hígado²⁶ tabla 2.

Tabla 2. Principales CYP Humanos y Sustratos Sobre los que actúan.

<i>Subfamilia</i>	<i>Enzima</i>	<i>Sustrato</i>
CYP1 A	1 A1 1 A2	Policíclicos aromáticos de hidrocarbano cafeína, fenacetina
CYP1 B	1 B1	Algunos hidrocarburos policíclicos, 17 b-estradiol.
CYP2 A	2 A6	Cumarina (metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, nitrosamina encontrada en tabaco, nicotina.
CYP2 B	2 B6	4-hidroxilacion de ciclofosfamina, S-mefenitoina-demetilacion, ciertos barbitúricos.
CYP2 C	2C19 2C9 2C8	Anticomvulsivos, omeprazol, diazepam, propanodol, imipramina y otros fármacos. Fenitoina, drogas anti-inflamatorias y tolbutamida. Taxol, ácido retinoico.
CYP2 D	2D6	Antihipertensivos, antidepresivos y neurolépticos como: b-bloqueantes, metoprolol, propanodol, desipramida, clomipramida, clozapina, trifluoperidol, dimetilacion de codeína a morfina entre otros.
CYP2 E	2E1	Alcohol, tetracloruro de carbono, benceno , mutagenos y carcinogenos.
CYP3 A	3 A4 3 A5 3 A7	60% de medicamentos usadas clínicamente como eritromicina, nifedipina, lidocaina, ciclosporina, tamoxifeno, lovastatina, dapsona, testosterona cortisol. Mismo patrón de sustratos que CYP3 A4. Forma fetal; metaboliza sustratos de CYP3 A4.
CYP4 A	4 A11	Ácidos grasos, clofibrato (medicamento hipolipidémico)

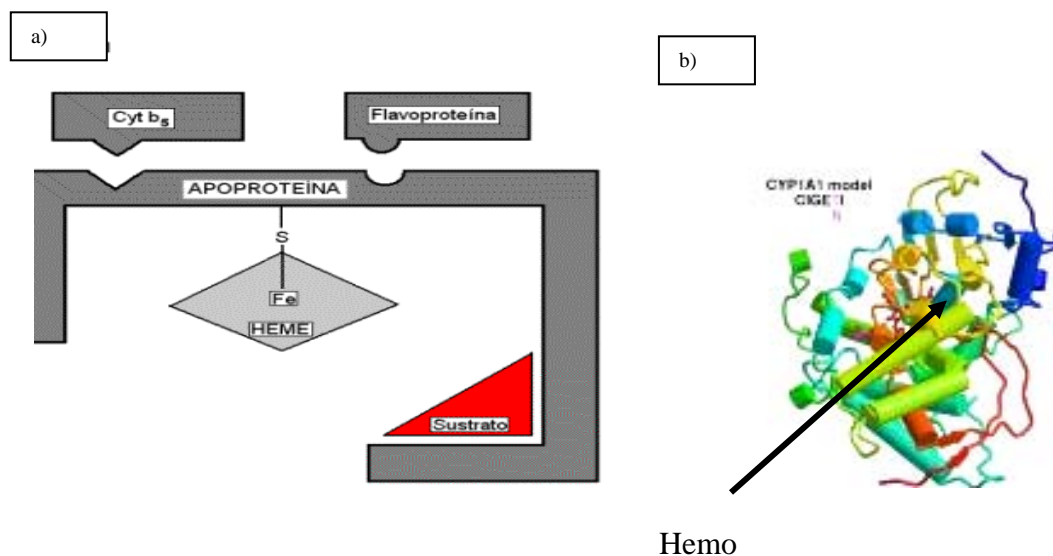
(Tomada de Santiago, C, et al. 2002)

Debido a que el principal objetivo ha sido el estudio de los polimorfismos genéticos que presentan la superfamilia del CYP P450 por su ya probada relación con el desarrollo de cáncer de pulmón, diabetes, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis entre otras ^{28,29}. Esta superfamilia enzimática, en el caso de organismos eucariotas, ha sido detectada prácticamente en todas las membranas subcelulares examinadas ^{30,31} siendo la mitocondria y retículo endoplasmico las fuentes más importantes. ^{5,32,33}

1.3. Características del CYP P450.

El Citocromo P450 está formado por hemo-proteínas intracelulares que activan oxígeno molecular para el metabolismo oxidativo de una gran variedad de moléculas orgánicas capaces de transportar electrones. La característica principal es que contienen una parte proteica (apoproteína) y un grupo hemo (grupo prostético) y son proteínas que contienen aproximadamente 500 aminoácidos. En el carboxilo terminal presentan una cisteína que permite que se forme un ligando-tiol para el grupo hemo. El amino terminal de la proteína es rico en aminoácidos hidrofóbicos y actúa como dominio para unirse a proteínas de membrana ^{34,7} **figura1**.

Figura 1. Se muestran a) componentes, la parte proteica, el grupo prostético y la cisteína que une al grupo hemo, b) la estructura tridimensional del citocromo P450 donde se señala con una flecha el grupo hemo de color morado.



El citocromo P450 es miembro de la clase de enzimas llamadas oxigenasas pero específicamente el P450 es monooxigenasa³⁵. Cataliza reacciones en las que solamente se incorpora uno de los dos átomos de oxígeno dentro del producto químico liberando H₂O por los equivalentes de reducción proporcionados por NADH o NADPH habitualmente transferidos al P450 o vía citocromo bs, gracias a una flavo-proteína oxido-reductasa³⁴ figura 2.

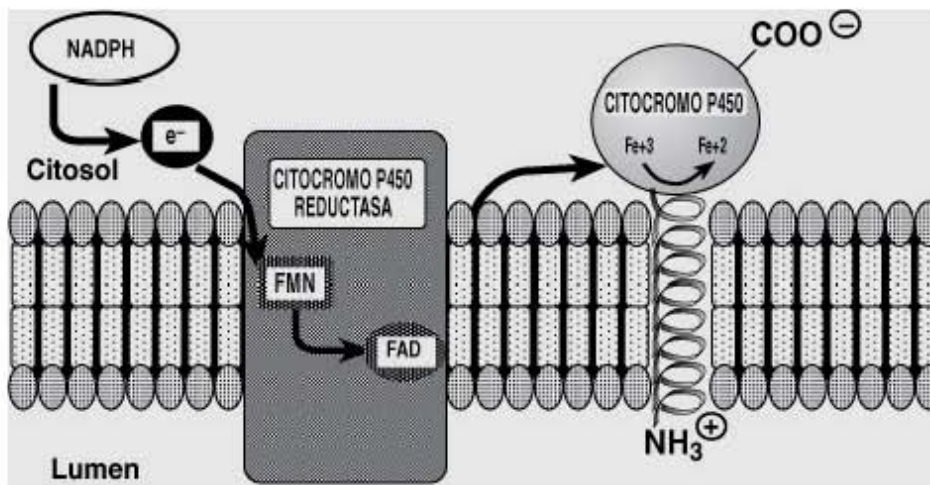


Figura 2. Traspaso de electrones desde el NADPH al citocromo P450, catalizado por la enzima de membrana NADPH citocromo P450 reductasa.

2.- Familia CYP1A.

Uno de los principales P450 que se ha estudiado por la importancia que este representa para la desintoxicación de muchos sustratos químicos foráneos y endógenos, fármacos, drogas, procarcinógenos, pesticidas y xenobióticos es la familia CYP1A. Esta familia está constituida por los genes CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1 localizados en el cromosoma humano 15q22-ter^{36,37}. Los tres comparten la característica de ser activados por policíclicos aromáticos de hidrocarbóno (PAH), aminas heterocíclicas que se encuentran en el ambiente, y fundamentalmente en el humo de cigarro.

Los PAH comprenden una gran familia de compuestos que presentan dos o más anillos fusionados de benzeno que pueden contener nitrógeno, sulfuro y oxígeno como el benzo (a) pireno, benzo(a) antraceno, naftaleno, fenantreno entre otros. Los PAH tienen una gran importancia en la actividad biológica de procesos mutagénicos y carcinogénicos. Se pueden encontrar presentes en el ambiente, en alimentos, así como en la emisión de contaminantes industriales derivados de petróleo, hierro y aluminio ³⁸, por lo que han sido relacionados con la inducción de cánceres de origen químico ³⁹.

2.1 Citocromo P4501 A1 (CYP 1A1).

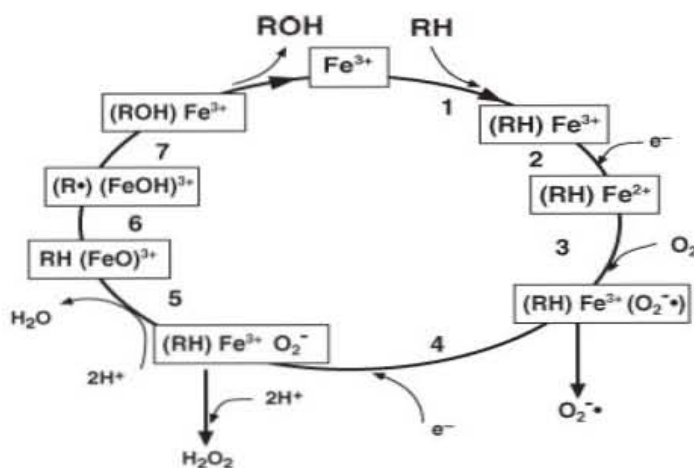
El CYP1A1 se encuentra en retículo endoplasmico hepático y contribuye notablemente en la desintoxicación de muchos carcinógenos, especialmente los policíclicos aromáticos de hidrocarbóno (PAH) ⁵. Perteneciente a la familia CYP1A, el CYP1A1 es considerado de interés ya que está involucrado en la promoción de tumores por numerosos procarcinógenos químicos³⁶. Esta enzima considerada de fase I metaboliza PAH semejantes a benzo (a) pireno, el cual es uno de los componentes tóxicos producidos durante la combustión del cigarro y la emisión de contaminantes derivados de petróleo, entre otros ^{29,38}. Se tiene la evidencia que el CYP1A1 por su elevada actividad enzimática y la elevada producción intracelular, eleva la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y metabolitos reactivos. Esto tiene como consecuencia el deterioro de la célula por la generación de estrés oxidativo y la oxidación de macromoléculas biológicas que producen oxiguaninas que propician alteraciones a nivel de la transcripción en el DNA ⁴⁴. Reportes previos han demostrado *in vitro* que una sobre exposición al benzo(a)pireno como sustrato aumenta la cantidad de CYP1A1 intracelularmente ⁴⁰⁻⁴³.

La elevada actividad enzimática y el control de la expresión se han correlacionado con los polimorfismos genéticos del gen CYP1A1⁴⁰⁻⁴³.

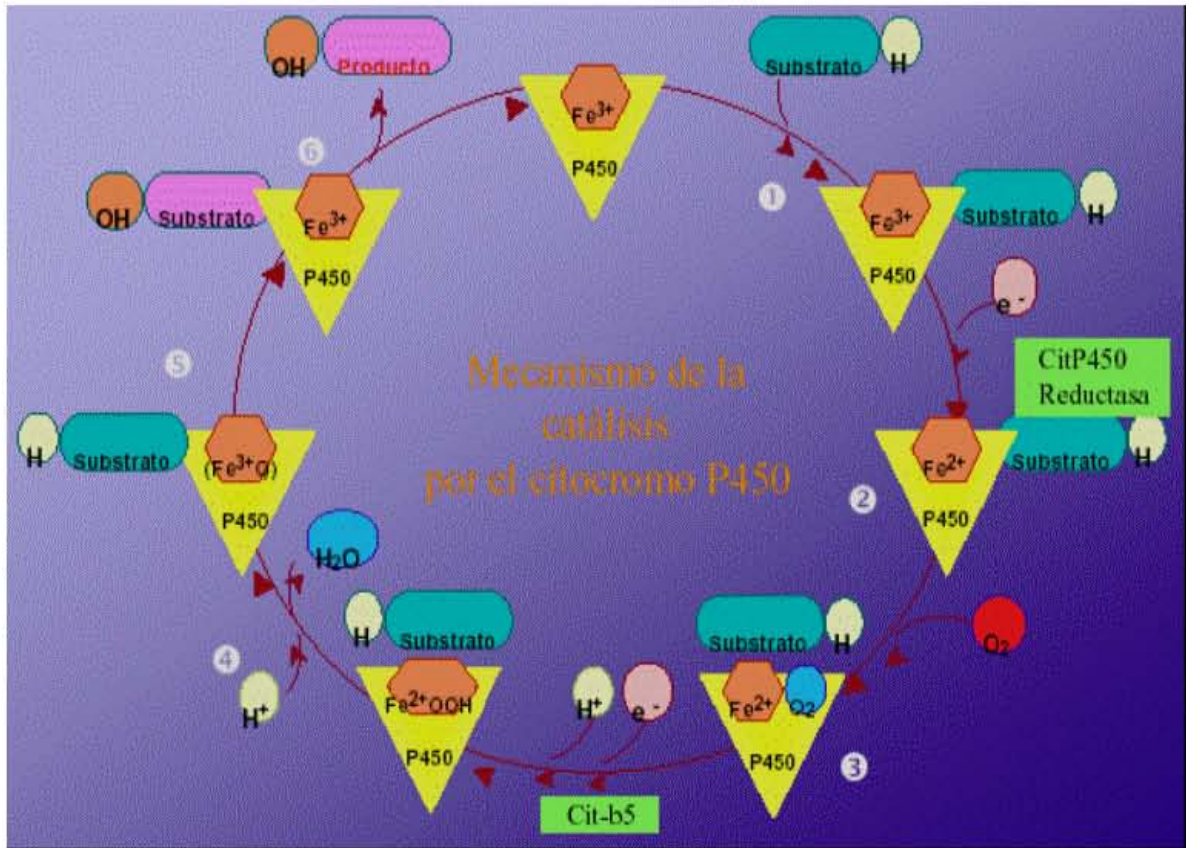
2. 2. Mecanismo del procesamiento de desintoxicación.

El CYP1 A1 pasa por una serie de reacciones donde: a) la forma ferrica de la hemo-proteína inicialmente reacciona con el sustrato formando un complejo; b) el complejo sustrato-P450 es reducido por un transportador de electrones (NADH); c) ya reducido se forma un complejo ferroso-sustrato que reacciona con el oxígeno molecular formando un complejo ternario conformado por P450-sustrato-ferroso-oxígeno; d) el complejo ternario después se vuelve a reducir por un segundo transportador de electrones NADH (en la cual el oxígeno molecular por un arreglo molecular permite la incorporación del átomo de oxígeno al sustrato químico); dando como resultado del ciclo, e) el complejo ferrico mas el sustrato químico oxidado y agua (ROH y H₂O). Este después se disocia generando el sustrato oxidado (epoxido), agua y el complejo ferrico P450 que participara en el metabolismo de otro sustrato químico^{34,5,45} figura 3.

Figura 3. Modelo a) y b) representación del mecanismo del CYP 1 A1, en los cuales se representa las reacciones químicas que se llevan acabo durante un ciclo catalítico.



Modelo a) Mecanismo de acción del citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P450 (CYP) propuesto por Coon⁵. En él, el Fe³⁺ representa al hierro del grupo hemo del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido (O₂^{-•}) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂).



Modelo b) Mecanismo de catálisis por el citocromo P450, así como las estructuras que participan en la entrada y salida de electrones para obtener el sustrato (epoxidado) y agua como resultado final del ciclo.

Por lo tanto el proceso de biotransformación es resultado de las reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, mediadas por la enzima de fase I (CYP1A1). Resultado que provee, el sustrato oxidado (epoxido) que es altamente lipofílico y polar, y que en algunos casos puede ser excretado directamente por vía biliar (proceso poco común). Sin embargo hay otros procesos de excreción, en los cuales el epoxido es catalizado por un complejo de enzimas localizadas en retículo endoplasmico llamado mezcla de función de oxidasas de fase II (MFO II). Las MFO II se encuentran relacionadas con reacciones de sulfación, glucoronidación y acetilación. Al reaccionar el epoxido con las MFO II, permiten la formación de dioles ó dioles epoxido que son

altamente hidrofílicos, que al conjugarse con el ácido glucónico o glutatión forman metabolitos que son excretados por vía renal y vía biliar en condiciones de normalidad figura 4¹⁻⁹.

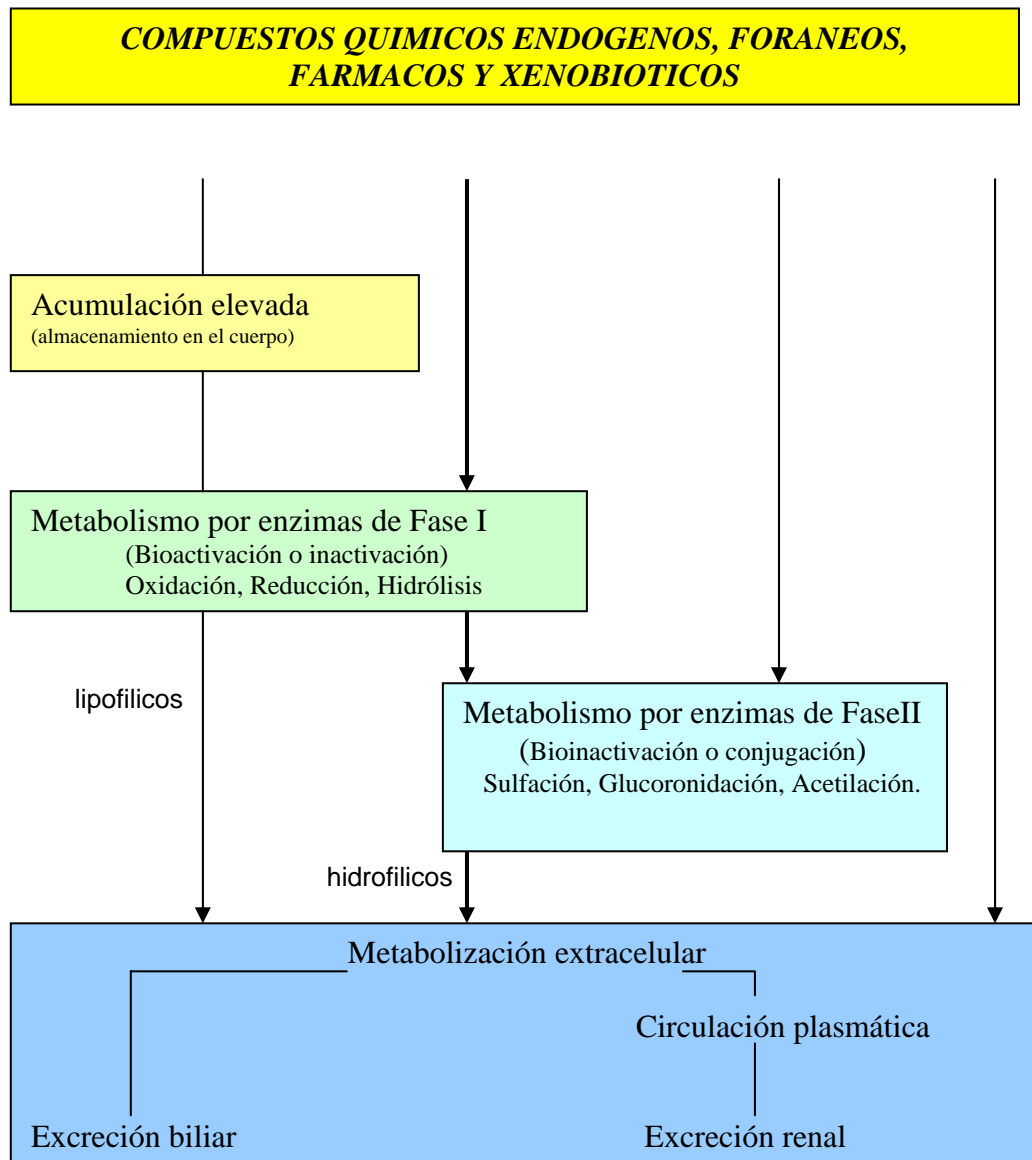


Figura 4. Panorama general del proceso de desintoxicación de químicos endógenos, foráneos, fármacos y xenobióticos.

Se ha reportado que la elevada actividad de la enzima CYP1A1 produce epóxidos polares y lipofílicos que más adelante serán transformados por una enzima epóxidohidrasa (EH) a dihidrodióles epóxido (moléculas altamente

hidrofilicas). Los dihidrodioles son altamente reactivos ya que ataca sitios nucleofilicos en el DNA directamente formando aductos de DNA, los cuales culminaran en daño a DNA figura 5 ³⁸.

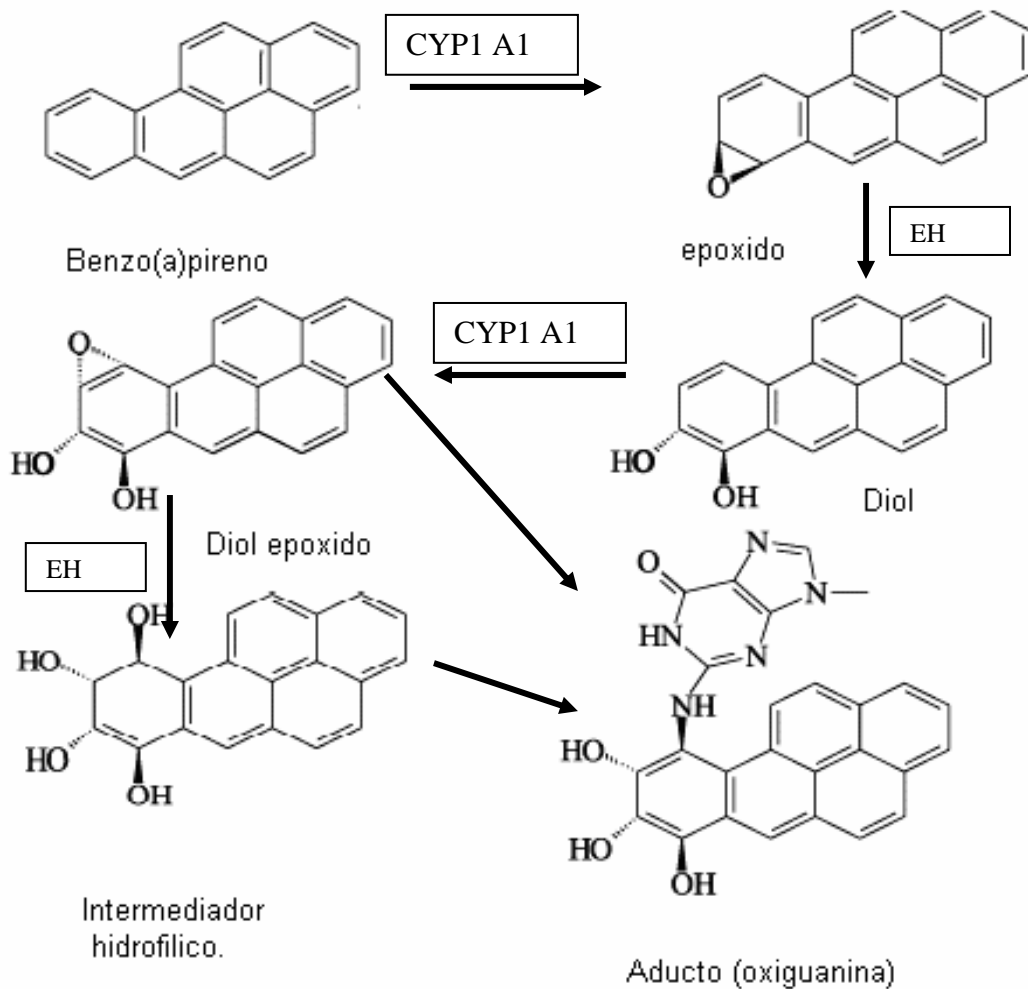


Figura 5. Proceso de biotransformación de benzo (a) pireno, en el cual se muestra que CYP1A1 regula la epoxidación, así como la formación de intermediarios hidrofílicos formados por la epoxidohidrasa (EH) que son altamente reactivos por formar aductos que tienen efecto sobre el DNA.

2.3. Genética del CYP1 A1.

El gen que codifica para el citocromo CYP1A1 se encuentra localizado en el cromosoma humano 15q22-ter ^{36,37}, junto con los genes que codifican para el CYP1A2 y CYP1B1. Sin embargo el CYP1A1 constituye la mayor fracción del sitio en el cual se localizan estos tres genes localizados en el

cromosoma 15q22-ter. Las proteínas codificadas por estos genes son activadas por policíclicos aromáticos de hidrocarbano (PAH).

El gen CYP1A1 es polimorfo y presenta 4 sitios de variación en las posiciones C4887A, A4889G, T5639C y T6235C ^{46,47}. De estas posiciones, la A4889G y la T6235C se han reportado asociadas con el desarrollo de varios tipos de cáncer. Estudios in vitro y de expresión revelan que la posición T6235C se localiza en la region 3' no codificante y esta relacionada directamente con la actividad enzimática del CYP1A1. La presencia del alelo C (*m2) en esta posición se asocia con la susceptibilidad genética a cáncer de pulmón, así mismo se tiene reportado que individuos con el genotipo C/C (*m2/*m2) tiene mayor susceptibilidad a desarrollar carcinomas ^{48,52}.

La segunda posición (A4889G) localizada en el codon 462 del exón 7, tiene efecto en la estructura de la proteína ya que se localiza en la region de unión al grupo hemo. En este caso la presencia de la base "A" genera el aminoácido isoleucina, mientras que la base "G" genera valina. Diversos reportes sugieren que la presencia del alelo G (Val) se asocia con el desarrollo de cáncer de pulmón. ^{49,52}.

Graeme B. y colaboradores hicieron una recopilación de los diferentes estudios en los cuales se han relacionado estos dos sitios polimorficos con riesgo a padecer cáncer de pulmón, coló-rectal, y de estomago en distintas poblaciones.

Sin embargo, recientemente el estudio de los sitios polimorficos de este gen se ha relacionado con enfermedades como diabetes, enfermedad arterial coronaria, y aterosclerosis entre otras ^{28, 29,48,49, 52,59-64}.

2.4. Estudios poblacionales del gen CYP1 A1.

Los estudios poblacionales del gen CYP1A1 son bastos en la literatura, y de los muchos reportes que existen se refieren principalmente a las poblaciones Caucásicas (USA, UK, Francia, Alemanes) y Orientales (Japón, Taiwán, y China), así como población de origen Africano^{48,50-54}.

Cabe mencionar que en la literatura no hay mucha información sobre los polimorfismos genéticos del gen CYP1A1 en poblaciones Amerindias. Los pocos estudios en estas poblaciones han sido realizados en Chile y Rio de Janeiro Brasil, en los que se reportan diferencias genotípicas y alelicas del gen CYP1A1 al compararse con Caucásicos y Orientales respectivamente⁵⁵⁻⁵⁷.

Recientemente Kvitko K. y colaboradores estudiaron cinco tribus Brasileñas (Surui, Gavião, Zoró, Xavante y Wai Wai) que viven en la region central y Amazónica de Brasil. Estas tribus se compararon con la población Caucásica de Brasil, mostrando grandes diferencias de la diversidad alelica y genotípica. Las diferencias entre los grupos Caucásicos y Orientales con los Amerindios reportados hasta la fecha, muestra grandes diferencias en las frecuencias tanto alelicas como genotípicas. Considerando muy importante el estudio de poblaciones Amerindias y en particular de las poblaciones indígenas Mexicanas, las cuales son muy diversas y pueden ayudar a entender la microevolución de gen CYP1A1 en el mundo; Así como también permitirán establecer el grado de mestizaje entre las distintas poblaciones del continente Americano y otras poblaciones inmigrantes.

2. 5. Enfermedades Relacionadas con el Polimorfismo de CYP1 A1.

Diversos estudios han tratado de establecer la participación del gen CYP1A1 en la susceptibilidad de diversas enfermedades. Los trabajos realizados hasta la fecha concierne a la participación del gen CYP1A1 en

la susceptibilidad de algunas enfermedades son escasos y muy controversiales. Algunos investigadores han tratado de establecer una asociación entre los polimorfismos genéticos del CYP1A1 y la susceptibilidad a enfermedades tales como desordenes cardiovasculares, diabetes, aterosclerosis y varios tipos de canceres ^{28, 29,48,49, 52,59-64}.

La mayoría de los estudios relacionan los dos sitios polimorficos localizados en el gen CYP1A1 en la posición A4889G y T6235C. La posición T6235C se localiza en la region 3' no codificante esta relacionada directamente con la actividad enzimática del CYP1A1. La presencia del alelo C (*m2) en esta posición se asocia con la susceptibilidad genética a cáncer de pulmón, así mismo se tiene reportado que individuos con el genotipo C/C (*m2/*m2) desarrollan carcinoma ^{48,52}. La segunda posición (A4889G) localizada en el codón 462 del exón 7, tiene efecto en la estructura de la proteína ya que se localiza en la region de unión al grupo hemo. En este caso la presencia de la base "A" genera el aminoácido isoleucina, mientras que la base "G" genera valina. Diversos reportes sugieren que la presencia del alelo G (Val) se asocia con la susceptibilidad al desarrollo de cáncer de pulmón ^{29,49,52}. Por lo que los dos sitios polimorficos localizados en el gen CYP1A1 en la posición A4889G y T6235C se han asociado con la susceptibilidad a desarrollar varios tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y aterosclerosis ^{28,29,48,49, 52,}

59-64

3. Migración.

El estudio poblacional del gen CYP1A1 y las diferencias genotípicas y alelicas entre las distintas poblaciones de caucásicos, asiáticos, africanos y amerindios se puede fundamentar de acuerdo a la teoría de las tres migraciones (Amerindia, Na-Dene y Eskimo-Aleut) que se suscitaron en Asia durante la era glacial a través del estrecho de Bering hace 30,000 años⁸³.

Debido a que el rasgo genético fundamental de las migraciones, es la transferencia de genes de una localización geográfica a otra. Los emigrantes portan sus genes al territorio habitado por una población receptora; genes que se entremezclan con el pool génico de la población huésped. Con ello se produce simultáneamente: a) un incremento de la variabilidad genética dentro de cada una de ambas poblaciones, emigrante y receptora; b) una reproducción de las diferencias genéticas que pudieran existir entre ellas.

Lo más importante es que las migraciones son el vehículo de uno de los mecanismos evolución, donde la evolución es definida como cambio en la frecuencia génica de una población. Así, pues, los efectos genéticos de la migración lo serán sobre el pool génico de la población receptora y sobre el pool génico de la población de origen dependerán de los efectos de la magnitud y de la naturaleza de las migraciones.

Uno de los ejemplos más clásicos de esta influencia es el de la población caribeña de Centroamérica, que a comienzos del siglo XVII el pool génico de las Antillas estaba formado exclusivamente por genes amerindios. Entre 1517 y 1646 se añadió a ese pool génico el componente africano, procedente de los esclavos y de los fugados o cautivos de los territorios limítrofes. Tras una serie de vicisitudes, una parte de la población, conocida como la de los negros del

caribe, se instaló en las Honduras británicas, Guatemala y Nicaragua. A partir de ello tuvo lugar una dispersión rápida a lo largo de unos mil kilómetros de la costa de América Central, con la subsiguiente entrada de genes europeos. De esta manera, en la población resultante se ha podido detectar la contribución africana por la presencia de marcadores tales como el gen S^u del sistema de grupos sanguíneos MNS, el haplotipo $Gm^{z, a; b}$ en las inmunoglobulinas. La presencia europea por la presencia del haplotipo $Gm^{f; b}$ del sistema Gm. La contribución de las comunidades indígenas se ha atestiguado por la presencia de los genes del grupo sanguíneo ABO, Rh y de la albúmina México. Con el uso de estos marcadores se ha llegado a la obtención de los siguientes valores como contribución relativa al acervo génico actual: genes amerindios 56%, genes caucásicos, 40% y genes africanos 4%. Ejemplo de cómo los genes de una población inmigrante han llegado a predominar sobre los de la población receptora^{65, 84,85}.

3.1. Poblaciones Indígenas de México.

El número de indígenas en el continente americano antes de la llegada de los europeos se calcula en 90 a 110 millones. Tan solo el imperio inca presentaba entre 14 y 30 millones y dicha cantidad era mayor en la región de mesoamérica. Una vez realizada la conquista y con la llegada de los europeos, el número de indígenas se redujo de forma importante. Se sabe que esta disminución se debió en gran parte a las enfermedades que trajeron consigo los grupos europeos. Después de este fenómeno, el número de indígena se redujo y en la actualidad se estime la existencia de 8 a 15 millones de indígenas. Estos están incluidos en 56 grupos étnicos bien definidos desde el punto de vista lingüístico y antropológico. La mayoría de estos grupos se han incluido en 5 troncos lingüísticos que son: Tarasco, Macro-Mixteco, Macro-Maya, Macro-Nahua y Macro-Yuma. Sin embargo, algunos grupos no han podido ser clasificados desde el punto de vista lingüístico y entre ellos se encuentran los indígenas Teenek.⁶⁶

Desde la colonia, pasando por el período independiente, la revolución y hasta el presente, existe un gran debate acerca del concepto y caracterización de indígena o indio.

Cuando los europeos entraron en contacto con las sociedades originarias del continente americano, les asignaron la categoría de "indígenas" o de "indios" a los diversos pueblos que mantenían identidades propias y culturas específicas; una categoría diferente e inferior desde el punto de vista racial, cultural, lingüístico, intelectual o religioso. De tal forma, la diversidad étnica de todos los habitantes quedó anulada y sin posibilidades de desarrollo propio y evolución.

Entonces los pueblos indígenas se caracterizan por su situación de colonizados y excluidos del proyecto de sociedad, que desconoce las características étnicas que los diferencian de la sociedad. Debido a que la cultura del grupo dominante que se postulo como superior y excluye a las originarias del territorio mexicano. Por tanto no existen en términos reales los indios, sino las culturas étnicas, y lo indio aparece como una categoría colonial. Por lo que la construcción de una sociedad incluyente, democrática, tendería a la desaparición de la categoría colonial con la cual se caracteriza a los pueblos indígenas.

La documentación etnográfica disponible sobre cada sociedad o pueblo indígena de México es abundante. El perfil nacional de los pueblos indígenas revela el tipo de relaciones asimétricas entre la sociedad dominante y los pueblos herederos de la civilización mesoamericana y cómo se dan en condiciones de inequidad, injusticia y exclusión. Los grupos étnicos de México se deben reconocer como sociedades históricas de larga sustentabilidad y permanencia en un territorio geográfico y cultural donde originalmente fueron autónomas, y que hoy aspiran a continuar su reproducción económica, cultural, social y política dentro del contexto nacional mexicano. Existen pueblos indígenas con un enorme número de habitantes, que poseen identidades muy sólidas, y otros en vías de extinción.

Las demandas de las organizaciones indígenas contemporáneas movilizan energías para descolonizar, eliminar la categoría de indio, y fortalecer la posibilidad de conducir su propia historia y su propio destino.

Definición de indio

Definición de lo indígena y lo étnico basada en el trabajo de Guillermo Bonfil ⁶⁷,
El concepto de indio en América: Una categoría de la situación colonial.

...es una categoría supraétnica que no denota ningún contenido específico de los grupos que abarca, sino una particular relación entre ellos y otros sectores del sistema social global del que los indios forman parte. La categoría indio denota la condición de colonizado y hace referencia necesaria a la relación colonial... El indio nace cuando Colón toma posesión de la Isla Hispañola a nombre de los Reyes Católicos. Antes del descubrimiento europeo la población del Continente Americano estaba formada por una gran cantidad de sociedades diferentes, cada una con su propia identidad, que se hallaban en grados distintos de desarrollo evolutivo: desde las altas civilizaciones de Mesoamérica y los Andes, hasta las bandas recolectoras de la floresta amazónica.

3.2. Identidad Indígena

El indígena de hoy es muy distinto del que prevalecía en la época colonial e, incluso, hace 30 años. Sin embargo, a pesar de los cambios, mantiene ciertos rasgos culturales de su origen y persiste sin asimilarse, sin renunciar a su identidad, la que se expresa en formas de: vida comunitaria, comunicación oral a través de su lengua, relación con la naturaleza, medicina y una sabiduría ancestral. El mantenimiento, a lo largo del tiempo, de la identidad

étnica y cultural está estrechamente vinculado con el funcionamiento de instituciones sociales y políticas.

La cosmovisión y filosofía de los pueblos indígenas se manifiestan en su simbología lingüística, en una manera de ver el mundo, de practicar las relaciones humanas, de concebir la relación del hombre con la naturaleza que, penetrada por un profundo misticismo y religiosidad, involucra todas las instituciones de las sociedades indígenas: la familia, las ceremonias religiosas, el gobierno y las relaciones productivas.

Los pueblos indígenas otorgan a sus sacerdotes y chamanes, como en el pasado precolonial, dones de sabiduría, al mismo tiempo que sacralizan sus actividades dentro de la comunidad. A través de ellos se comunican con las deidades antiguas y modernas del cristianismo. Asimismo, construyen sistemas simbólicos, donde ocultan la cosmovisión propia, utilizando los símbolos e imágenes de la religión católica.

La exclusión de esta realidad ha determinado, en la mayoría de los casos, el fracaso de los proyectos de desarrollo implementados y dirigidos hacia las regiones indígenas, queriendo sustituir su cultura en vez de desarrollarla. En la comunidad indígena se combina lo tradicional con lo "moderno", relación que ha modificado ciertas formas comunitarias, sus gustos, su lengua y sus formas de organización. Esta dinámica, que se observa en el mundo indígena, es el resultado de un choque entre dos fuerzas: por un lado, el sistema tradicional obstaculiza la fácil entrada de lo moderno y por el otro, lo moderno tiende a intervenir en la vida de las comunidades. Comprender y aceptar la realidad indígena contemporánea, permitirá que los proyectos de desarrollo impulsados

en las regiones indígenas incorporen esta dimensión étnica como un factor potencial del desarrollo de estos pueblos ^{68,69}.

3.3. *Lenguas indígenas*

Los idiomas indígenas constituyen el eje central de la identidad, como vehículo de comunicación entre los miembros de la comunidad y con las otras comunidades de la región étnica. Las lenguas indígenas se clasifican por grupos lingüísticos, troncos, familias, subfamilias y lenguas que se encuentran reportadas en la pagina web (www.ini.gob.mx).⁷⁰

Al igual que las demás lenguas indígenas del mundo, las de México tienen rasgos característicos que las asemejan o las distinguen de otras; tienen fonética, estructura y léxico. El idioma castellano, como lengua de comunicación nacional, ha sido influido por las lenguas vernáculas de las distintas regiones indígenas. La creencia de que las condiciones de pobreza de los pueblos indígenas se deben a que no hablan o no dominan el castellano, es un prejuicio muy difundido ^{70,73}.

Desde el punto de vista del desarrollo, se ha comprobado que el fortalecimiento de los sistemas propios de comunicación de los pueblos indígenas constituye un factor clave para el acceso a la educación formal, básica, media y superior, para el cambio social y cultural y para los proyectos de desarrollo productivo. La negación de sus lenguas condujo al ocultamiento del ser indígena, integrándose a medias al idioma nacional.

Los pueblos indígenas se autodenominan en su lengua, lo que les otorga la adscripción al grupo étnico. De la misma manera, desde el exterior se les identifica con determinados nombres. En la tabla 3. Refiere a la "Toponimia" nombres comunes con los que son designados y su propia denominación ^{70,73}.

Tabla 3. TOPONIMIA refiere nombre común, auto denominación y significado de cada grupo indígena existente en México.

NOMBRE COMUN	AUTODENOMINACION	SIGNIFICADO
1. Tojolabales	Tojolwinik'otik	Hombres legítimos o verdaderos
2. Tarascos	Purépechas	Gente o persona
3. Chichimeca, jonáz	Ézar	Indios
4. Triques	Tinujei	Hermano mío
5. Zoque	O'depüt	Gente de idioma
6. Popoluca	Homshuk	Dios del maíz
7. Tzeltales	Inc. Atel	Hombres trabajadores
8. Tzotziles	Batsil Inc.'otik	Hombres verdaderos
9. Mochos	Mochos o motozintlecos	
10. Huasteco	Teenek	Los que viven en el campo
11. Nahua	Macehuale	Campesino
12. Otomí	Hña hñu	Hablantes de otomí
13. Huicholes	Wirrárika	La gente
14. Kikapú	Kikaapoa	Los que andan por la tierra
15. Mazahuas	Mazahuas	Donde hay venado
16. Mazatecos	Ha shuta enima	Gente de costumbre
17. Mayas	Mayá	Nombre del territorio
18. Matlazincas	Matlazinca	Los que hacen redes
19. Mayos	Yoremes	La gente de la ribera
20. Mixes	Ayuuk	La gente
21. Chinantecos	Tsa ju jmí	Gente de palabra antigua
22. Chatitos	Kitse cha'tnio	Trabajo de las palabras
23. Coras	Nayeri	
24. Suaves	Mero ikooc	Verdaderos nosotros
25. Seris	Kon kaak	La gente
26. Tarahumara	Rarámuri	Corredores a pie
27. Tepehuanes	Odámi	Gente
28. Zapotecos del Istmo	Binnzá	Gente que proviene de las nubes
29. Zapotecos de Valles	Ben'zaa	Gente de las nubes
30. Zapotecos Sierra Norte	Bene xon	Gente de las nubes
31. Totonacos	Totonacos	Hombre de tierra caliente
32. Tlapanecos	Me'phaa	El que está pintado
33. Chochos	Runixa ngiigua	Los que hablan el idioma
34. Choles	Inc.	Hombre o milpero
35. Yaquis	Yoremes	Hombre
36. Amuzgos	Tzjon non	Pueblos de hilados
37. Chontales de Oaxaca	Slijuala xanuc'	Habitantes de las montañas
38. Chontales de Tabasco	Yokot' anob	El pueblo de habla yoko
39. Guarijíos	Macurawe	Los que andan por la tierra
40. Mames	Mam	Padre, abuelo o antepasados
41. Pimas	O'ob	La gente
42. Pápagos	Thono o'otham	Gente del desierto
43. Pames	Xi'úi	Indígena
44. Mixtecos	Nuu savi	Pueblo de la lluvia
45. Lacandón	Hach Inc.	Verdaderos hombres

46. Kumiai	Kumiai	
47. Cucapá	Cucapá	
48. Paipai	Akwa'ala	
49. Cochimí	Diegueño	
50. Kiliwa	Kj'wash	
51. Ocuilteco	Tlahuica	
52. Popolocas		
53. Ixcatecos		
54. Cluj		
55. Jacaltecós	Abxubal	
56. Tepehua	Hamasipini	

A) INDIGENAS MAYOS

Se autodenominan "*Yoreme*" (*el que respeta*).

Según una antigua leyenda de su tradición oral mayo significa: *la gente de la ribera*

a) Ubicación General

La etnia Mayo se asienta al Sur de Sonora en Alamos, Navojoa, Etchojoa y Huatabampo figura 7. En Sonora habitan, principalmente en las riberas del Río Mayo en alrededor de 242 localidades, se estima una población indígena de 72,000 habitantes, la cual representa el 25% de la población total de la región y poco menos del 4% del Estado.

II. OBJETIVOS

Debido a la importancia que tienen los genotipos del gen CYP1A1 en la susceptibilidad a desarrollar algunas enfermedades y a la diferente distribución en los grupos estudiados, los objetivos del presente trabajo fueron:

a) Objetivo General

Determinar la distribución que tiene los polimorfismos del gen CYP1A1 en individuos mestizos Mexicanos, así como en dos grupos indígenas de México (Mayos y Teenek).

b) Objetivos Específicos

- ✓ I) Analizar las frecuencias tanto alelicas como genotípicas del CYP1A1 en un grupo de individuos mestizos y en dos grupos indígenas de México (Teenek y Mayos).
- ✓ II) Una vez definidas dichas frecuencias comparar y establecer la relación entre las diferentes poblaciones en estudio.
- ✓ III) Comparar las frecuencias génicas y alelicas del CYP1A1 de las poblaciones mexicanas con otras poblaciones reportadas en la literatura.

III. METODOLOGIA

Tipo de Estudio: El diseño experimental fue de tipo prospectivo, transversal y comparativo.

Sujetos de Estudio: El estudio se realizó en 212 individuos sanos no relacionados, en los que se incluyeron 2 grupos indígenas mexicanos (Teenek y Mayos) y un grupo de mestizos mexicanos. El grupo de mestizos mexicanos incluyó 106 individuos, considerando Mestizos a aquellos individuos que por tres generaciones, incluyendo la presente hayan nacido en México. Un mestizo está definido como aquel que nace en México, que descende de habitantes de origen autóctono y principalmente de individuos de origen Español, Caucásico y Negroide quienes llegaron al continente americano durante el siglo XVI.

Los grupos indígenas son los siguientes:

Mayos: Este grupo incluyó 54 individuos provenientes del sur de Sonora en Álamos (localizados en el norte de México); cabe mencionar que dicho grupo se encuentra clasificado dentro del tronco lingüístico Macro-Yuma (datos según el Instituto Nacional Indigenista)^{70,71} que se encuentran localizados dentro de la región Etchojoa y Huatabampo.

Teenek: Este grupo incluyó a 52 individuos provenientes del pueblo de San Francisco Coyoalab en el Estado de San Luis Potosí. Cabe mencionar que dicho grupo no se encuentra clasificado desde el punto de vista lingüístico (Datos según el Instituto Nacional Indigenista)^{70,71} y se encuentra localizado dentro de la región de la Huasteca.

A) Tamaño de la Muestra:

Para calcular el tamaño aproximado de la muestra se va a realizar de acuerdo a la siguiente fórmula, utilizando un paquete estadístico para el cálculo de la misma.

a) Fórmula para un estudio de prevalencia de proporciones.

$$n = \frac{N Z^2 p (1-P)}{D^2 (N-1) + Zc^2 P (1-P)}$$

n= Efecto de diseño (Tamaño de la muestra)

N= Población total

Z= Valor de Z (corresponde al valor de confianza)

D= Precisión absoluta (valor de confianza deseado, 5%)

P= Proporción esperada en la población (10%)

Para lo cual los datos necesarios son:

- Precisión deseada %
- Prevalencia esperada
- Efecto de diseño
- Nivel de confianza

B) Extracción de ADN.

El ADN genómico se aísla de sangre periférica por el método de expulsión salina⁷⁶.

C) La determinación del sitio polimórfico A4889G Exon7.

Los genotipos se determinaron por la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos de alelo.^{48,49} Cada muestra se amplificó por reacciones por separado usando uno de los dos cebadores de inicio 5' : 5'-GAAGTGTATCGGTGAGACCA -3' ó 5'-GAAGTGTATCGGTGAGACCG -3'. En ambas reacciones se incluyó el cebador de reversa 3', que va de 5'-GTAGACAGAGTCTAGGCCTCA -3'. La amplificación fue hecha en un termociclador Perkin Elmer modelo 9700 (Foster City, CA. USA) con el siguiente programa de amplificación figura 9 a) y 9 b).

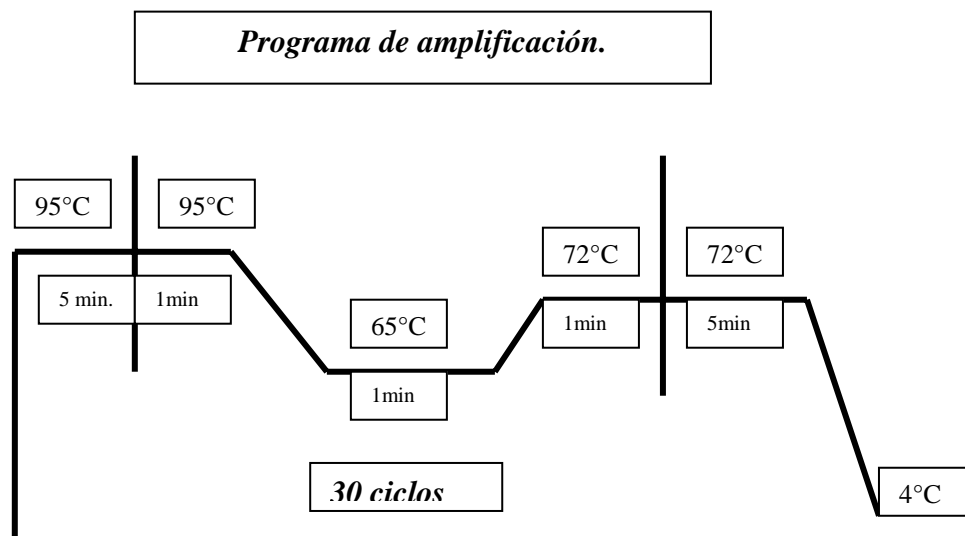


Figura 9 a). Se representa el programa de amplificación, en el cual se representa una desnaturalización a 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min. 65°C por 1 min. y 72°C por 1 min. Una extensión final de 72°C por 5 min. El producto fue verificado por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.8%, que se tiñe con bromuro de etido y se visualiza en luz UV.

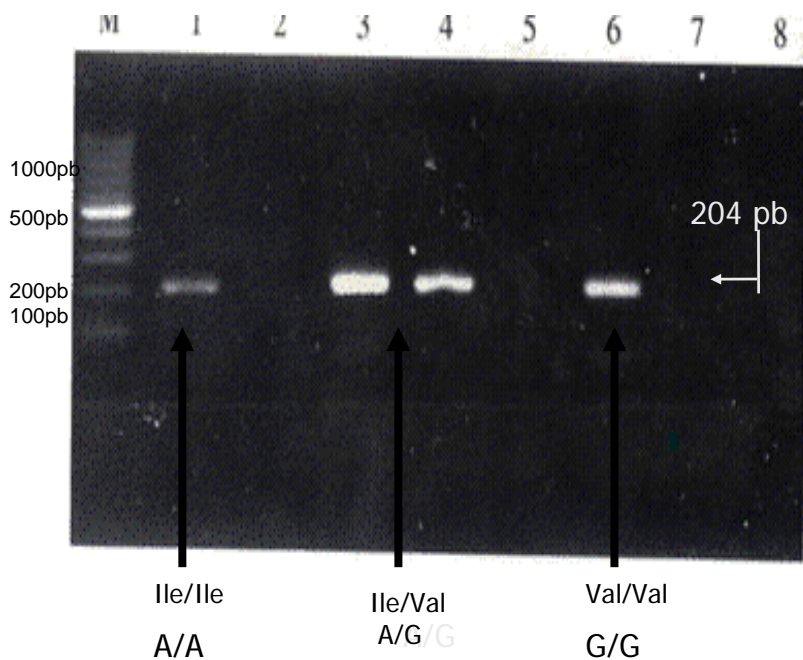


Figura 9 b). Se observan en un gel de agarosa al 1.8%, los distintos genotipos analizados por PCR A-E del sitio polimórfico A4889G exon 7. El pozo 1 detalla el genotipo homocigoto para Ile/Ile tipo silvestre, en los pozos 3, 4 el genotipo heterocigoto para Ile/Val y en el pozo 6 el genotipo homocigoto mutante para Val/Val.

D) La determinación del sitio polimórfico T6235C.

Los genotipos se determinaron por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa – fragmentos de restricción polimórfica (siglas en inglés PCR-RFLP) por medio de enzima de restricción. En la cual se utilizaron los cebadores previamente reportados²⁹. Cebador de inicio: 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3' y cebador de reversa: 5'-TAGGAGTCTTGTCTGATGCCT-3'. La amplificación se realizó en el termociclador Perkin Elmer 9700 (Foster City, CA. USA) con el siguiente programa figura 10 a) y 10 b).

Programa de amplificación.

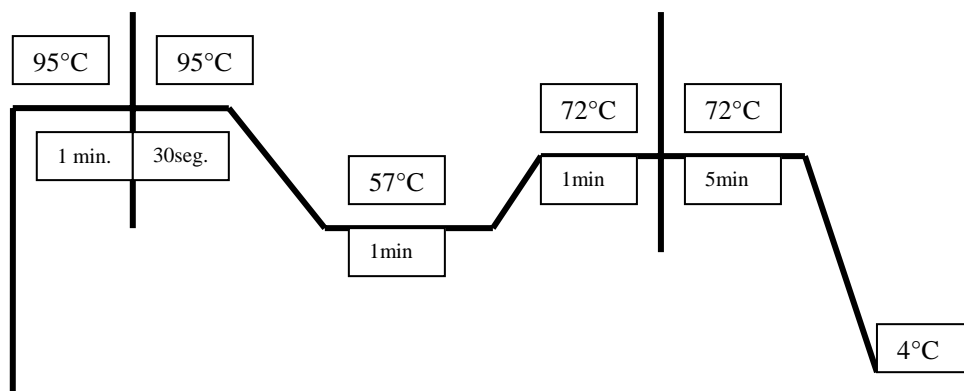


Figura 10 a). Se representa una desnaturalización ha 95°C por 1 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 seg. 57°C por 1 min. y 72°C por 1 min. Seguido por una extensión final de 72°C por 5 min. El producto fue digerido con una enzima de restricción *Msp I* a 37°C por 3 horas y se verificó por medio de una electroforesis en un gel de agarosos al 1.8%, que se tiñe con bromuro de etido y se visualiza en luz UV.

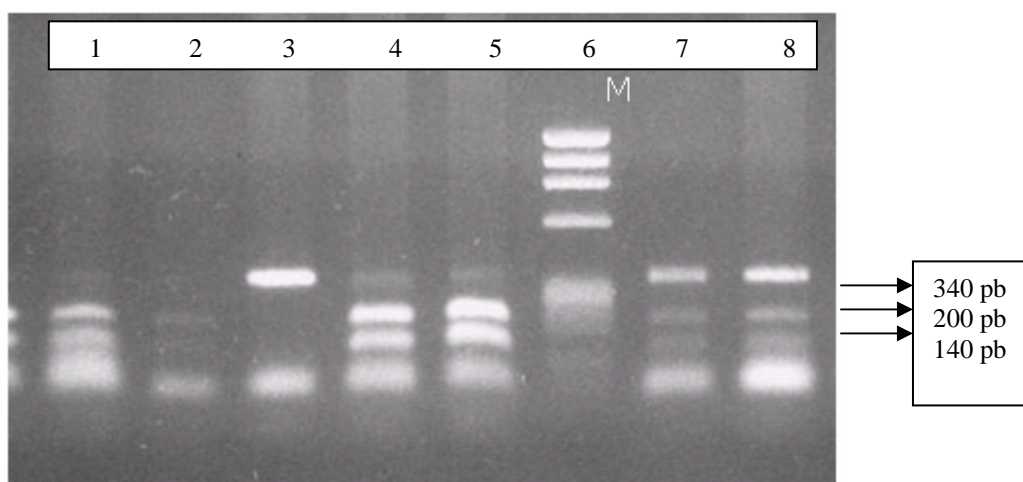


Figura 10 b). Se observa en el gel de agarosa al 2%, los distintos genotipos analizados por PCR-RFLP en la region no codificante 3´ T6235C, en la cual se utiliza la enzima de restricción la cual se detalla en materiales y métodos. En el pozo 3 se observa el genotipo homocigoto *m1/*m1 tipo silvestre 340 pb, en los pozos 1, 4 y 5 genotipo homocigoto *m2/*m2 considerado mutante 200 y 140 pb y en los pozos 7 y 8 el genotipo heterocigoto *m1/*m2 340, 200 y 140 pb, los cuales se miden con el marcador Hae III X174.

E) Análisis Estadístico.

Las frecuencias genotípicas y alelicas del gen CYP1 A1 se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de Chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos se determinaron por la prueba de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico EPIINFO. La prueba Exacta de Fisher se utilizó cuando algún número en la tabla de contingencia fue menor de 5.

IV RESULTADOS.

Las frecuencias genotípicas y alelicas de los polimorfismos del gen CYP1 A1 en la posición T6235C (localizado en la region 3' no codificante) y la posición A4889G (localizada en el codón 462 en el exón 7) en las tres poblaciones mexicanas son mostradas en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Frecuencia genotípica (fg) y alelica (fa) del sitio polimórfico A4889G del CYP1A1 en población Mexicana.

	Mestizo Mexicano		Teenek		Mayos	
A4889G	n=96		n=52		n=54	
Alelo	n	fa	n	fa	n	fa
A (Ile)	126	0.656*	36	0.346	49	0.454
G (Val)	66	0.344*	68	0.654	59	0.546
Genotipo	n	fg	n	fg	n	fg
AA (Ile/Ile)	36	0.375*	5	0.096	8	0.148
AG (Ile/Val)	54	0.562	26	0.50	33	0.611
GG (Val/Val)	6	0.062*	21	0.404	13	0.241

Todas las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy – Weinberg, con un intervalo de confianza menor de 0.05 ($pC < 0.05$).

*Se observa un incremento en la (fa) del alelo (*Ile) y la (fg) del genotipo (*Ile/*Ile) y una disminución en la (fa) del alelo (*Val) y (fg) del genotipo *Val/*Val) cuando se compara con Teenek y Mayos ($pC < 0.05$).

Tabla 2. Frecuencia genotípica (fg) y alelica (fa) del sitio polimórfico T6235C del CYP1A1 en población Mexicana.

	Mestizo Mexicano		Teenek		Mayos	
T6235C	n=106		n=42		n=48	
Alelo	n	fa	n	fa	n	fa
T (m1)	127	0.599	24	0.286**	51	0.531
C (m2)	85	0.401	60	0.714**	45	0.469
Genotipo	n	fg	n	fg	n	fg
TT (m1/m1)	41	0.387	1	0.024**	15	0.312
TC (m1/m2)	45	0.425	22	0.524	21	0.437
CC (m2/m2)	20	0.187	19	0.452***	12	0.250

Todas las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy – Weinberg, con un intervalo de confianza menor de 0.05 ($p < 0.05$).

**Se observa un incremento en la (fa) del alelo *m2 y una disminución (fa) del alelo *m1, así como (fg) del genotipo *m1/*m1 cuando se compara con Mestizos y Mayos ($p < 0.05$).

***Se observa un incremento de la (fg) del genotipo *m2/*m2 cuando se compara con los Mestizos y Mayos ($p < 0.05$).

Las frecuencias observadas y esperadas de las tres poblaciones en estudio en los dos sitios polimórficos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. La distribución del polimorfismo A4889G es similar en las dos poblaciones Amerindias de México, pero diferente cuando se compara con Mestizos.

En los Mestizos Mexicanos se observa un incremento en la frecuencia del alelo A (*Ile) y el genotipo AA (*Ile/*Ile) cuando es comparado con las poblaciones Amerindias de México ($p < 0.05$).

El análisis en la posición T6235C mostró un incremento en la frecuencia del alelo *m2 en Teenek cuando se compara con Mestizos y Mayos ($p < 0.05$) y del genotipo *m2/*m2 cuando se compara con Mestizos ($p < 0.05$). También en el grupo Teenek se observa un decremento en la frecuencia del alelo *m1 y del genotipo *m1/*m1 cuando se compara con Mestizos y Mayos ($p < 0.05$).

Las frecuencias alélicas de estos polimorfismos en las tres poblaciones (Mestiza, Teenek y Mayos) fueron comparadas con las reportadas en otros grupos étnicos (Amerindios de Sudamérica, Caucásicos, Asiáticos y Africanos) Tabla 3.

En esta comparación se observa que Caucásicos y Africanos son grupos con frecuencias elevadas del alelo *Ile en la posición 4889 (94.8% y 97.5% respectivamente) y del alelo *m1 en la posición 6235 (90.6% y 76.1% respectivamente). Observando que las poblaciones Amerindias (México y Sudamérica) presentan una baja frecuencia de estos dos alelos. La frecuencia del alelo *Ile en la posición 4889 varía de 3.0% en los Xavantes a un 46% en los Surui, así mismo la frecuencia del alelo *m1 en la posición 6235 varía de 4.0% en los Surui a un 53.8% en Mayos. En general, los grupos Amerindios de México junto con las poblaciones Amerindias de Sudamérica presentaron elevada la frecuencia del alelo *Val en la posición 4889 y del alelo *m2 en la posición 6235, sin embargo estas frecuencias varían de acuerdo al grupo étnico en estudio.

Tabla3. Frecuencias alélicas (%) de los sitios polimórficos del gen CYP1A1 en diferentes poblaciones.

Frecuencias alélicas							
POBLACIÓN	A4889G			T6235C			Referencias
	n	G(*Val)	A(*Ile)	n	T(*m1)	C(*m2)	
Mestiza	96	34.4 ^a	65.6	106	59.9	40.1 ^b	Presente estudio
Teenek	52	65.4 ^c	34.6	42	28.6	71.4 ^d	Presente estudio
Mayos	54	54.6 ^e	45.4	48	53.1	46.9 ^f	Presente estudio
Xavante	21	97.0	3.0	21	5.0	95.0	Kvitko et al. ⁶¹
Wai Wai	26	81	19	26	19	81	Kvitko et al. ⁶¹
Zoró	30	76.0	24.0	30	13.0	87.0	Kvitko et al. ⁶¹
Gaviao	30	59	41	30	28.0	72.0	Kvitko et al. ⁶¹
Surui	24	54	46	24	4	96	Kvitko et al. ⁶¹
Mapuche	84	77.0	23.0	84	17.0	83.0	Muñoz et al. ⁵⁸
Asiáticos	1132	22.8	77.2	638	64.0	35.9	Garte et al. ⁵⁷
Caucásicos	4790	5.2	94.8	4453	90.6	9.3	Garte et al. ⁵⁷
Africanos	481	2.5	97.5	461	76.1	23.8	Garte et al. ⁵⁷

Todas las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy – Weinberg, con un intervalo de confianza menor de 0.05 (pC<0.05).

- a. **Decrece cuando se compara con Xavantes, Wai Wai, Zoro, Gaviao, Surui y Mapuche e incrementa cuando es comparado con la población Asiática, Caucásica y Africana (pC<0.05).**
- b. **Decrece cuando se compara con Xavantes, Wai Wai, Zoro, Gaviao, Surui y Mapuche e incrementa cuando es comparado con la población, Caucásica y Africana (pC<0.05).**
- c. **Decrece cuando se compara con Xavantes e incrementa cuando es comparado con la población Asiática, Caucásica y Africana (pC<0.05).**
- d. **Decrece cuando se compara con Xavantes, Surui e incrementa cuando es comparado con la población Asiática, Caucásica y Africana (pC<0.05).**
- e. **Decrece cuando se compara con Xavantes, Wai Wai, Zoro y Mapuche e incrementa cuando es comparado con la población Asiática, Caucásica y Africana (pC<0.5).**
- f. **Decrece cuando se compara con Xavantes, Wai Wai, Zoro, Gaviao, Surui y Mapuche e incrementa cuando es comparado con la población Caucásica y Africana (pC<0.05).**

IV. DISCUSION Y CONCLUSION.

Los sitios polimorficos localizados en el gen CYP1A1 se reportan asociados con la susceptibilidad genética a varios tipos de cáncer ^{77,46,48,52}. Esto es debido principalmente al importante papel que juega la enzima que es codificada por este gen. Esta enzima participa en la biotransformación de muchas moléculas de origen orgánico y xenobiotico en especial procarcinógenos xenobioticos constituyentes del humo de cigarro. Estas sustancias por lo general se encuentran emergidas en el ambiente, en alimentos, así como también en la emisión de contaminantes industriales derivados de petróleo, hierro y aluminio³⁸.

Se tienen reportes de la diferencia que hay entre razas con respecto a la distribución alelica y genotípica de estos polimorfismos^{53,55,58}. Por lo que, el presente estudio describe las frecuencias alelicas y genotípicas en Mestizos Mexicanos y dos poblaciones Amerindias Mexicanas (Mayos y Teenek) que provienen de troncos lingüísticos diferentes (Instituto Nacional Indigenista, México). Cuando las frecuencias alelicas y genotípicas son comparadas entre estos grupos y con otras poblaciones previamente descritas, las diferencias son notables; cabe mencionar que las frecuencias del alelo *m1 y del genotipo *m1/*m1 del sitio polimorfico en la posición 6235 se encuentran elevadas en el grupo Mayo cuando se compara con el grupo Teenek. Esta diferencia del grupo Mayo ya ha sido previamente reportada por nuestro grupo al estudiar otros genes polimorficos que incluyen a los marcadores de HLA, polipéptidos de bajo peso molecular (LMP), los receptores β -adrenergicos y la enzima convertidora de angiotensina (ACE) ⁷⁸⁻⁸¹.

En estos estudios se observa que los Mayos presentan importantes diferencias cuando se comparan con otros grupos Amerindios de México. Por lo tanto, el presente estudio corrobora estas diferencias utilizando un marcador polimorfo (CYP1A1) no estudiado previamente en estas poblaciones.

La distribución de los polimorfismos del CYP1A1 en poblaciones Caucásicas y Africanas es muy similar, debido a que se presenta elevada frecuencia de Isoleucina en la posición 4889 (94.8% en Caucásicos y de 97.5% en Africanos) y del alelo *m1 en la posición 6235 (90.6% en Caucásicos y 76.1% en Africanos). Contrario a estas poblaciones, los grupos Amerindios Mexicanos, así como los Amerindios de Sudamérica presentan altas frecuencias de Valina en la posición 4889 y del alelo *m2 en la posición 6235. El presente estudio es el primero en poblaciones Amerindias del Norte de América y sugiere que los alelos *Val (4889) y *m2 (6235), se encuentran presentes en frecuencias elevadas en todas las poblaciones Amerindias del continente americano. Así mismo también los datos sugieren que estos alelos se encontraban presentes en los primeros amerindios nativos que llegaron de Asia a través del estrecho de Bering hace 30,000 años durante la era glacial, debido a que se ha sustentado que los primeros nativos provienen de la primera migración, ya que se sustenta que en el mundo hubo tres migraciones (Amerindia, Na – Dene y Eskimo – Aleut) que permitieron el paso del hombre de Asia al continente americano ^{82,83}. También se sugiere que las frecuencias elevadas de los alelos *Ile en la posición 4889 y de *m1 en la posición 6235 en la población mestiza mexicana son resultado de la mezcla con individuos caucásicos que arribaron a México durante el siglo XVI.

Los alelos *Val y *m2 en las posiciones 4889 y 6235 respectivamente se encuentran fuertemente asociados con varios tipos de cánceres (pulmón, intestino, colórectal y bronquial)^{77,46,48,52}.

Como se menciona, estos alelos se encuentran en alta frecuencia en la población mexicana, principalmente en los grupos amerindios. Desafortunadamente, hasta el momento nosotros no tenemos datos de la prevalencia de cáncer en estas dos poblaciones Amerindias Mexicanas que presentan frecuencias elevadas de los alelos *Val y *m2. Por lo que futuros estudios ayudaran a esclarecer si las frecuencias elevadas de los alelos *Val y *m2 en la población Amerindia confieren mas susceptibilidad a el desarrollo de cáncer en estas poblaciones.

En resumen el presente estudio corrobora las frecuencias elevadas de los alelos *Val y *m2 en el gen CYP1A1 en las poblaciones Amerindias, con un estudio en grupos étnicos Mexicanos no estudiados previamente con estos marcadores. También se observan algunas diferencias que son notables entre las poblaciones Mexicanas que se correlacionan con diferencias lingüísticas. A medida que los alelos del CYP1A1 se han asociados con el desarrollo de cáncer y otras enfermedades, el conocimiento de la distribución de estos alelos (*Val y *m2) en las poblaciones Mexicanas (Mestizos y Amerindios) ayudara a esclarecer el papel que tienen los marcadores en la susceptibilidad genética a factores ambientales presentes en estas poblaciones.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Martinez C, Albert C, José AG. et al. 1999. Comparative in vitro and in vivo inhibition of cytochrome P450 CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A by H₂-receptor antagonists. *Clin Pharmacol Ther.* 65: 369-76.
- 2.- Hodgson, E, Goldstein, J. A. 2001. Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics. In *Introduction to Biochemical Toxicology*. 3rd Ed. (Ed. Hodgson, E y Smart, R. C.) Wiley-Interscience
- 3.- Glue P and Clement RP. 1999. Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism-Basic Concepts and Methods of Assessment. *Cell Mol Neurobiol.* 19: 309-23.
- 4.- Stegeman JJ, Livingstone DR. 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative Biochemistry and Physiology part C.*121:1-3.
- 5.- Coon MJ, XinXin D, Steven JP, and Alfin D. N. Vaz. 1992. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* 6: 669-673.
- 6.- Wislocki PG, Miwa GT, Lu AYH. 1980 In: *Enzymatic Basis of Detoxication* (Jakoby WB. ed) Vol 1, 135-182, Academic Press, New York.
- 7.- Nebert DW, Gonzales FJ. 1987. P450 genes: structure, evolution and regulation. *Ann Rev Biochem.* 56: 945-93.
- 8.- Guengerich FP. 1991. Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J Biol Chem.* 266: 10019-10022.
- 9.- Porter TD, Coon MJ. 1991. Cytochrome P450. Multiplicity of Isoforms, substrates and catalytic and regulatory mechanism. *J Biol Chem.* 266: 13469-13472.

- 10.- Ortiz de Montellano PR. 1995. Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, 2nd Ed, Plenum Press, New York.
- 11.- Black SD and Coon MJ. 1986. In: Cytochrome P450, 161-216, P Ortiz de Montellano, Ed. Plenum, New York.
- 12.- Ladero JM, Garcia-Agúndez JA, Benitez J. 1998. Enzymatic polymorphism and Lung cancer. *Med Clin (Barc)*. 111: 465-470.
- 13.- Kingenberg, M. 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 75: 376-386.
- 14.- Garfinkel, D. 1958. Studies on pig liver microsomes. I. Enzymatic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*. 77: 493-509.
- 15.- Omura, T and Sato, R. 1964a. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*. 239: 2370-2378.
- 16.- Omura, T and Sato, R. 1964b. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification and properties. *J Biol Chem*. 239: 2379-2385.
- 17.- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al. 1996. P450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 6: 1-42.
- 18.- Degtiarenko, K. 1999 ,Internet Homo Page.
<http://www.icgeb.trieste.it/p450>.

- 19.- Ogita K, Kusunose E, Yamamoto S, Ichihara K and Kusunose M. 1983
Multiple forms of cytochrome P450 from kidney cortex microsomes of rabbits treated with Phenobarbital. *Biochem Int.* 6: 191-198.
- 20.- Cohen G. In: handbook of Neuro-chemistry. A. Lajtha, Ed, 2nd ed. Plenum, New York. Vol4: 315-329.
- 21.- Nakajin S, Shively JE, Yuan PM, Hall PF. 1981. Microsomal cytochrome P450 from neonatal pig testis: two enzymatic activities (17 alpha-hydroxylase and c17, 20-lyase) associated with one protein. *Biochemistry.* 20:4037-4042.
- 22.- Kaku M, Ichihara K, Kasunose E, Ogita K, et al. 1984. Purification and characterization of cytochrome P450 specific for prostaglandin and fatty acid hydroxylase activities from the microsomes of rabbit small intestinal mucosa. *J Biochem (Tokio).* 96: 1883-91
- 23.- Dalh AR, Hadley WM, Hahn FF, Benson JM, McClellan RO. 1982. Cytochrome P450 dependent monooxygenases in olfactory epithelium of dogs: possible role tumorigenicity. *Science.* 216: 57.59.
- 24.- Serajbit-Singh CJ, Wolf CR, Philpot RM, Plopper CG. 1980. Cytochrome P450: localization in rabbit lung. *Science.* 207: 1469-1470.
- 25.- Williams DE, Hale SF, Okita RF, Master BS. 1984. A prostaglandin omega-hydroxylase cytochrome P450 (P-450PG-omega) purified from lungs of pregnant rabbits. *J Biol Chem.* 259: 14600-14608.
- 26.- Van der Hoeven TA. Coon MJ. 1974. Preparation and properties of partially purified cytochrome P450 and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome P450 reductase from rabbit liver microsomes. *J Biol Chem.* 249: 6302-6310.

- 27.- Santiago C, F Bandrés y F. Gómez-Gallego. 2002. Polimorfismos de Citocromo P450: Papel como Marcador Biológico. *Medicina del Trabajo*. 11:130-140.
- 28.- Kiyohara C, Nakanishi Y, Inutsuka S, et al. 1998. The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population. *Pharmacogenetics*. 8: 315-23.
- 29.- Wang XL, Greco M, Sim AhS, Duarte N, Wang J, David E. L. Wilcken. 2002. Effect of CYP1A1 MspI polymorphism on cigarette smoking related coronary artery disease and diabetes. *Atherosclerosis*. 162: 391-397.
- 30.- Stasiecki P, Oesch F, Bruder G, Jarasch ED, Franke WW. 1980. Distribution of enzymes involved in embolism of polycyclic aromatic hydrocarbons among rat liver endomembranes and plasma membranes. *Eur J Cell Biol*. 21: 79-92.
- 31.- Oesch F, Bentley P, Golan M, Stasiecki P. 1985. Metabolism of benzo(a)pyrene by subcellular fractions of rat liver : evidence for similar patterns of cytochrome P450 in rough and smooth endoplasmic reticulum but not in nuclei and plasma membrane. *Cancer Res*. 45: 4838-43.
- 32.- Lee CP, Schatz G, Dallner, G. 1981. *Mitochondria and Microsomes*. Ed. Addison-Wesley Reading. Massachusetts.
- 33.- Nebert DW, Negishi M, Lang MA, Hjelmelend LM, Eisen HJ. 1982. The Ah locus, a multigene family necessary for survival in a chemically adverse environment: comparison with the immune system. *Adv Genet*. 21: 1-52.
- 34.- Hasler JA, Estabrook R, Murray M, et al. 1999. Human cytochromes P450. *Mol Aspects Med*. 20: 1-137.

- 35.- Hayaishi O. 1962. History and scope. In: O. Hayaishi (Ed), Oxigenases. Academic Press, New York. 1-29.
- 36.- Urban P, Jobert AS, Laine R, and Pompon D. 2001. Cytochrome P450 (CYP) mutants and substrate-specificity alterations: segment-directed mutagenesis applied to human CYP1A1. *Biochem Soc Transacts.* 29 part 2: 128-135.
- 37.- C. Roland Wolf, John S. Miles, Alan Gough and Nigel K. Spurr. 1990. Molecular Genetics of the human cytochrome P450 system. *Biochem Soc Transacts.* 18: 21-24.
- 38.- Guillen P. Sopelana and M.A. Partearroyo. 1997. Food as a Source of Polycyclic Aromatic Carcinogens. *Reviews on Environmental Health.* 12: 133-45.
- 39.- Nebert DW, McKinnon RA, Puga A. 1996. Human drug-metabolizing enzyme polymorphisms: effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol.* 15: 273-280.
- 40.- Aparajita D, Devendra P, Monika D, Alok D, Prahlad K. Shet. 2001. Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in blood lymphocytes Evidence for catalytic and mRNA expression. *Life Sciences.* 69: 383-393.
- 41.- Brooks RA, Goodrham NJ, Edwards RJ, Boobis AR, Winton DJ. 1999. The mutagenicity of benzo(a)pyrene in mouse small intestine. *Carcinogenesis.* 20: 109-14
- 42.- Puntarulo S, Cederbaum AI. 1998. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radiac Biol Med.* 24: 1324.30

- 43.- Morel Y, Mermod N, Barouki R. 1999. An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H₂O₂ and NFI. *Mol Cell Biol.* 19: 6825- 32.
- 44.- Park J-YK, Shigenaga MK, Ames BN. 1996. Induction of cytochrome P4501A1 by 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin or indol (3,2-b)carbazole is associated with oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 2322- 7.
- 45.- Guengerich FP. 1992. Characterization of human cytochrome P450 enzymes. *FASEB J.* 6: 745-748.
- 46.- Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. 1996. C4887A polymorphism in exón 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res.* 56: 4965-69.
- 47.- Mrozikiewics PM, Cascorbi I, Brockmoller J, Roots I. 1997. CYP1A1 mutations 4887A, 4889G, 5639G and 6235C in the Polish population and their allelic linkage, determined by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping. *J. Mol. Biol.* 7: 303-7.
- 48.- Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Wantanabe J. 1990. Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphism of the cytochrome P4501A1 gene. *FASEB J Lett.* 263: 131-133.
- 49.- Hayashi SI, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. 1991. PCR detection of an A/G polymorphism within exón 7 of the CYP1A1 gene. *Nucleic Acids Res.* 19: 4797.
- 50.- Graeme B. J. Smith, Patricia A, Harper, Judy M.Y.Wong, et al. 2001. Human Lung Microsomal Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) Activities: Impact of Smoking Status and CYP1A1, Aryl hydrocarbon Receptor, and Glutathione

- S-Transferase M1 genetic Polymorphism. *Cancer Epidemiol Biomark. Prev.* 10: 839-853.
- 51.- Le Merchand, L. Sivaraman, L, Leatham, L, and Lau, A. F. 1994. Genetic susceptibilities for lung cancer among Japanese, Caucasian and Native Hawaiians. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 35: 293
- 52.- Hayashi SI, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K. 1991. Genetic linkage of lung cancer-associated MspI polymorphism with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P4501A1 gene. *J Biochem.* 110: 407-411.
- 53.- Garte S, Trachman J, Crofts F, Toniolo P, Buxbaum J, Bayo S, Taioli E. 1996. Distribution of composite CYP1A1 genotypes in Africans, African-Americans and Caucasians. *Hum Hered.* 46: 121-127
- 54.- Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. 2001. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 10 : 1239-1248.
- 55.- Muñoz S, Vollrath V, Vallejos MP, Miquel JF, Covarrubias C, Raddatz A, Chianale J. 1998. Genetic polymorphism of CYP2D6, CYP1A1 and CYP2E1 in the South-Amerindian population of Chile. *Pharmacogenetics.* 8: 343-351.
- 56.- Sugimura H, Hamada G. S, Suzuki I, Iwase T, Kiyokawa E, Kino I and Tsugane S. 1995. CYP1A1 and CYP2E1 polymorphisms and lung cancer, cases-control study in Rio de Janeiro, Brazil. *Pharmacogenetics.* 5:S145-S148
- 57.- Hamada G. S, Sugimura H, Suzuki I, et al. 1995. The heme-binding region polymorphism of cytochrome P4501A1 (CYP1A1), rather than the RsaI

- polymorphism of IIE1 (CypIIE1), is associated with lung cancer in Rio de Janeiro. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 4: 63-67.
- 58.- Kvitko K, Nuñez JC, Weimer TA, Salzano FM, Hutz MH. 2000. Cytochrome P4501A1 polymorphism in South American Indians. *Hum Biol.* 72: 1039-1043
- 59.- Isner JM. 1999. Cancer and atherosclerosis: the broad mandate of angiogenesis. *Circulation.* 99: 1653- 5.
- 60.- Shwartz SM, Murry CE. 1998. Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions. *Annu Rev Med.* 49: 437-60
- 61.- Hansen ES. 1990. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC Working Paper 7/1/2. Shared risk factors for cancer and atherosclerosis—a review of the epidemiological evidence. *Mutat Res.* 239: 163-79
- 62.- Woodcroft KJ, Novak RF. 1997. Insulin effects on CYP2E1, 2B, 3A, and 4A expression in primary cultured rat hepatocytes. *Chem Biol Interact.* 107: 75-91.
- 63.- Woodcroft KJ, Novak RF. 1999. Insulin differentially affects xenobiotic-enhanced cytochrome P450 CYP2E1, CYP2B, CYP3A and CYP4A expression in primary cultured rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 289:1121-7.
- 64.- Matzke GR, Frye RF, Early JJ, et al. 2000. Evaluation of the influence of diabetes mellitus on antipyrine metabolism and CYP1A2 and CYP2D6 activity. *Pharmacotherapy.* 20: 182-90

- 65.- Martín-Municio A, García-Barreno P. 1996. Polimorfismo Génico (HLA) en Poblaciones Hispanoamericanas. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 100 – 101.
- 66.- Swadesh. 1959. Indian linguistic groups of Mexico. Escuela Nacional de Antropología e Historia. México.
- 67.- Bonfil G. 1995. Obras escogidas, México, CIESAS.
- 68.- Acevedo ML. 1996. *Educación interétnica*, México, Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH), Edición Científica.
- 69.- CIESAS e INI. 1994. *Historia de los pueblos indígenas de México*, tomos: I-VI, México.
- 70.- Pagina WEB. (www.ini.gob.mx)
- 71.- Instituto Nacional Indigenista y Secretaría de Desarrollo Social. 1995. *Etnografía contemporánea de los pueblos indígenas*, México.
- 72.- Aguilar Seleni Alejandro. 1995. Etnografía contemporánea de los pueblos indígenas (Noreeste-Los Mayos), Instituto Nacional Indigenista y Secretaría de Desarrollo Social. México.
- 73.- Avila Agustin, Barthas Brigitte, Cervantes Alma. 1995. *Etnografía contemporánea de los pueblos indígenas (Oriental-Los Huastecos de San Luis Potosí)*, Instituto Nacional Indigenista y Secretaría de Desarrollo Social. México.
- 74.- Ruvalcaba, Jesús (coordinador). 1998. *Nuevos aportes al conocimiento de la Huasteca*, México, CIESAS, Ediciones de la Casa Chata.
- 75.- Meade, Joaquín, *La Huasteca hidalguense*, Pachuca, Centro Hidalguense de Investigaciones Históricas, A.C. y Gobierno del estado de Hidalgo, s.f.

- 76.- Miller S, Dikes D, Polesky H, Watson L. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16:1215.
- 77.- Zhang ZY, Fasco MJ, Huang L, Guengerich FP, Kaminsky LS. 1996. Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1-Ile462 and-Val462: assessment of role for the rare allele in carcinogenesis. *Cancer Res.*56: 3926-3933.
- 78.- Vargas-Alarcón G, Gamboa R, Vergara Y, Rodríguez-Zepeda JM, de la Peña A, Izaguirre R, Zuñiga J, Ruiz-Morales JA, Granados J. 2002. LMP2 and LMP7 gene polymorphism in Mexican populations: Mestizos and Indians. *Genes Immun.*3:373-7.
- 79.- Vargas-Alarcón G, Hernandez-Pacheco G, Zuñiga J, Rodríguez-Peréz JM, Pérez-Hernandez N, Rangel C, Villarreal-Garza C, Martínez-Laso J, Granados J, Arnaiz-Villena A. 2003. Distribution of HLA-B alleles in Mexican Amerindian populations. *Immunogenetics.* 54: 756-760.
- 80.- Vargas-Alarcón G, Hernandez-Pacheco G, Rodríguez-Peréz JM, Pérez-Hernandez N, Pavon Z, Fragoso JM, Juárez-Cedillo T, Villarreal-Garza C, Granados J. 2003. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene insertion/deletion polymorphism in Mexican populations. *Hum Biol.* 75: 889-896.
- 81.- Fragoso JM, Rodríguez-Peréz JM, Pérez-Vielma, N, Martínez-Rodríguez N, Vargas-Alarcón G. 2005. B1-adrenergic receptor polymorphism Arg389Gly and Ser49Gly in the Amerindian and Mestizo populations of Mexico. *Hum Biol.* 77: 515-520.

- 82.- Cavalli-Sforza LL, Menozzi P, Piazza A. 1994. The history and geography of human genes. Princeton University Press.
- 83.- Bonatto SL and Salzano FM. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 1886-1871.
- 84.- Lisker R, Perez-Briceño R, Granados J, Babinsky V, de Rubens J, Armendarces S, Buentello L. 1986. Gene frequencies and admixture estimates in a Mexico City populations. Am J Phys Anthropol. 71: 203-7.
- 85.- Lisker R, Ramirez E, Briceño RP, Granados J, Babinsky V. 1990. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. Hum Biol. 62 . 791-801.

VII. ANEXOS.

TECNICA DE EXTRACCION DE DNA POR EL METODO DE EXPULSION SALINA.

1. Recolectar 8-10 ml de sangre total periferica con anticoagulante (EDTA).
2. En un tubo falcón de 50 ml. poner 40 ml de solución de lisis (SLR 1X), vaciar toda la sangre en el tubo. Mezclar vigorosamente la solución.
3. Centrifugar la solución a 1200 rpm/10 minutos
4. Quitar el sobrenadante con una pipeta con cuidado, sin tocar el precipitado.
5. Agregar nuevamente sol. SLR 1X hasta 40 ml. Centrifugar a 1200 rpm/10 minutos.
6. Quitar el sobrenadante; hasta que el precipitado este limpio (sin presencia de eritrocitos). En este paso se puede invertir el tubo y dejarlo escurrir. Repetir el lavado las veces necesarias para su limpieza.
7. Agregar en el tubo falcón: 259ul de agua estéril, 160ul de buffer de proteinasa, 40ul de SDS al 20% y 40ul de proteinasa K. disgregando el paquete.
8. Pasar el paquete disgregado con la solución a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Previamente marcado y mezclar vigorosamente.
9. Incubar a 37°C toda la noche o incubar a 55|°C durante 3 a 4 horas (en este caso agregar 20ul de proteinasa K).
10. Terminada la incubación agregar 240ul de NaCl 5M. Mezclar vigorosamente durante 40 segundos y centrifugar a 14000 rpm/ 10 minutos.
11. Recuperar el sobrenadante en otro tubo Eppendorf sin tomar el precipitado.
12. Centrifugar nuevamente a 14000 rpm/ 10 minutos y recuperar el sobrenadante.

13. Agregar etanol frio al 95% e invertir el tubo hasta que aparezca un precipitado blanco (DNA).
14. Centrifugar a 14000 rpm/10 minutos.
15. Se decanta el sobrenadante y se agrega etanol frio al 70%, con el propósito de lavar el DNA.
16. Centrifugar a 14000 rpm/10 minutos y se desecha el sobrenadante.
17. Secar el precipitado en un desecador de DNA durante 30 minutos.
18. Agregar de 50 a 100ul de TE (tris -EDTA) y someterlo a una temperatura de 65°C durante 3 horas para que se resuspenda el DNA en el agua.
19. Medir la concentración del DNA a 260 nm. La pureza se obtiene de medir el DNA a 260 nm y las proteínas a 280 nm, la relación entre 260/280 nos da la pureza. Este valor debe corresponder entre 1.7-1.8

PROCEDIMIENTO PARA AJUSTAR EL DNA.

Abs a 260 nm x 50 ng (que es el índice de densidad óptica) x 100ul (volumen de dilución)= [ng/ul] x vol total del tubo = ng totales en el tubo.

Para ajustar a 200 ng/ul dividir los ng totales entre 200 (concentración deseada) y la resultante restarle el volumen que ya se tienen en el tubo. El resultado es la cantidad que hay que agregar de agua a mi tubo para que quede ajustado el DNA a la concentración deseada; esto es 200 ng por ul.

EJEMPLO:

Abs 260 nm (0.056) x 50 ng x 100 (factor de dilución)=282.2 ng/ul

282.5 x 90ul (vol. del tubo)=25425 mg en 90 ul (concentración total)

244257/200 [concentración que deseo]=127.125ul - 90 (vol que ya tengo)=37.125ul

que necesitó agregar a mi tubo para tenerlo todo ajustado a 200ng/ul.

TECNICA DE PCR PARA CYP1A1 SITIO POLIMORFICO A4889G.

La amplificación es por medio de PCR alelo específico donde cada muestra es amplificada en dos reacciones por separado usando uno de los dos cebadores de inicio.

Reacción 1

DNTP´s (mezcla de deoxinucleotidos) 2mM-----4ul

Amortiguador de PCR 10X (Buffer)-----2.5ul

MgCl₂ (25mM)-----1.5ul

Iniciador derecho (E7-1)-----2.5ul

Iniciador izquierdo (E7-3)-----2.5ul

H₂O destilada-----10.6ul

Taq polimeraza-----.125ul

Reacción 2

DNTP´s (mezcla de deoxinucleotidos) 2mM-----4ul

Amortiguador de PCR 10X (Buffer)-----2.5ul

MgCl₂ (25mM)-----1.5ul

Iniciador derecho (E7-2)-----2.5ul

Iniciador izquierdo (E7-3)-----2.5ul

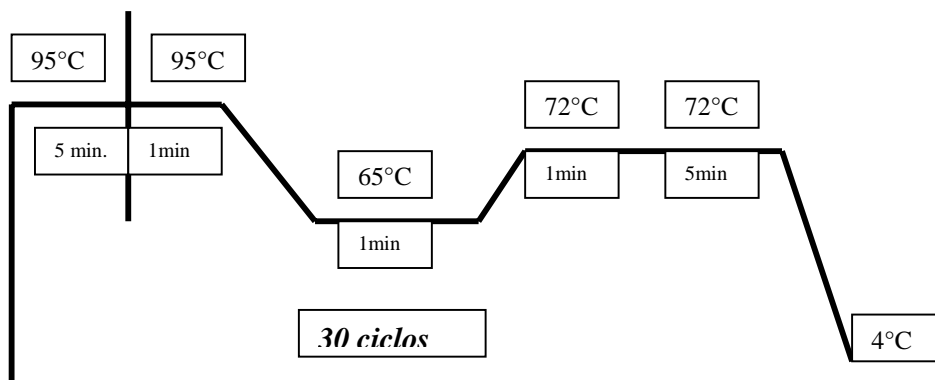
H₂O destilada-----10.6ul

Taq polimeraza-----.125ul

Se mezcla de cada reacción todo y se agrega 23.125 ul + 2ul de DNA=25ul totales en cada tubo.

CONDICIONES PARA EL TERMOCICLADOR:

Programa de amplificación.



- Desnaturalización: 95°C durante 1 minuto
- Alineamiento: 65°C durante 1 minuto
- Extensión: 72°C durante 1 minuto
- Extensión final a 72°C durante 5 minutos
- Durante 30 ciclos de amplificación.

Una vez finalizado el proceso de amplificación, verificar el amplificado en el gel de agarosa al 2%, agregando 5ul de colorante naranja G+5ul del amplificado. Esta mezcla se corre en un gel de agarosa a 80 Volts durante 30 minutos. El cual se verificara en un transiluminador de luz UV.

TECNICA DE PCR PARA CYP1A1 SITIO T6235C.

Mezcla que contiene todo lo necesario para realizar la amplificación

DNTP´s (mezcla de deoxinucleotidos) 2 mM-----4µl

Amortiguador de PCR 10X (Buffer)-----2.5µl

MgCl₂ (25mM) -----1.5µl

Iniciador (cyp 1 MspI)-----2.5µl

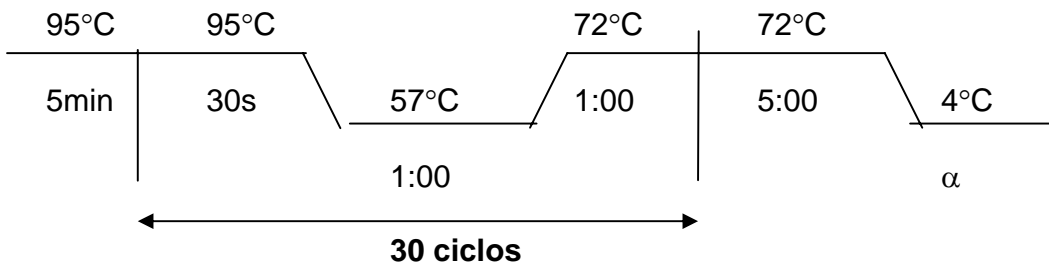
Iniciador (cyp 2 MspI)-----2.5µl

H₂O destilada-----10.75µl

Taq polimerasa-----125µl

- ❖ Se mezcla todo y se agrega 22.5µl al tubo + 2.5µl de DNA=25µl Totales en cada tubo.

Condiciones para el termociclador:



- ❖ Desnaturalización: 95°C durante 1 minuto
- ❖ Alineamiento: 57°C durante 1 minuto
- ❖ Extensión: 72°C durante 1 minuto
- ❖ Extensión final 72°C durante 5 minutos

Todo el proceso se realiza durante 30 ciclos.

- Una vez finalizado el proceso de amplificación, verificar el amplificado en gel de agarosa al 2%, agregando 5µl de colorante naranja G + 5µl del amplificado. Esta mezcla se corre en un gel de agarosa a 80 volts durante 30 minutos. Las bandas son observadas en un transiluminador y se compara el tamaño de las bandas con un marcador de peso molecular conocido.
- Una vez verificada la amplificación y corroborando el tamaño del amplificado se procede a digerir con una enzima de restricción, en este caso se utilizó la MspI

agregando 2 μ l del buffer correspondiente + 1 μ l de la enzima (MspI) + 17 μ l del amplificado

- Incubar a 37°C durante 3 horas o toda la noche.
- Después de la incubación la muestra se corre en un gel de azaroso al 3%. Cargar 15 μ l de la mezcla de DNA (amplificado y digerido). Utilizar el marcador de peso molecular *phi X174/hinf I*

INICIADORES UTILIZADOS:

CYP1A1 ---A4889G:

E7-1: 5'- GAAGTGTATCGGTGAGACCA-3'

E7-2: 5'- GAAGTGTATCGGTGAGACCG-3'

E7-3: 5'- GTAGACAGAGTCTAGGCCTCA-3'

CYP1A1---T6235C:

Cyp 1 MspI: 5' -CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT -3'

Cyp 2 MspI: 5' - TAGGAGTCTTGTCTGATGCCT -3'

PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA AL 2%

Se pesa 2 gramos de agarosa LE (Promega, Wi. USA), se disuelve en 5ml de TBE 10X y 95 ml de agua destilada. Para un volumen final de 100 ml..

Se calienta hasta que hierva y después se deja enfriar hasta 40° C aproximadamente.

Agregar 1.5µl de bromuro de etidio. Mezclar perfectamente.

Vaciar sobre la caja del gel y dejarlo secar cuando menos unos 25 minutos antes de usarlo.

Para correr el DNA mezclarlo con una solución "gel loading" de rojo de cresol a razón de 3:10µl

Vaciar las muestras en el gel sumergido en TBE 1X

Correr el gel a 80 mV durante 30 minutos aproximadamente

Se visualiza el gel en una lampara de luz ultravioleta.

PREPARACIÓN DEL TBE 10X (para preparar 1000ml)

Pesar Tris base 54grs

Ácido bórico 27.5 grs

0.5M de EDTA (pH=8.0) 20ml

Aforar con agua desionizada a pH 8.3

PREPARACION DE LOS DEOXINUCLEOTIDOS

Tomar 125 μ l de cada uno de los deoxinucleotidos (dTTP, dGTP, dATP, dCTP) (Promega Wi, USA), los cuales estan a 100 mM y agregar 9.5 ml de agua destilada y desionizada. La concentración final es de [1.25mM].

AJUSTE DE LA CONCENTRACION DE LOS INICIADORES (PRIMERS)

Para ajustar los iniciadores a 200 μ g/ml. Se toma la lectura en pmol iniciales y este valor se divide entre la concentración deseada, es decir 200, el valor resultante es el volumen de agua que agregamos par tener nuestros iniciadores ajustados a [200 μ g/ml Este será nuestro tubo madre.

SOLUCIONES PARA LA EXTRACCION DE DNA

SOLUCION PARA LA LISIS DE LAS CELULAS ROJAS (SLR)

Para un litro a 20X

50ml de Tris 2M =12.12grs.

50ml de MgCl₂ 1M =10.16grs.

100ml de NaCl 1M = 5.78grs.

Ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1L.

Para preparar 1L 1X

50ml de SLR (20X) aforar a 1000ml con H₂O.

BUFFER DE PROTEINASA K (5X)

Para 100ml

0.375M de NaCl = 2.19grs

0.12M de EDTA =4.46grs

Ajustar el pH a 8 y aforar a 100ml con H₂O.

Filtrar.

PROTEINASA K

Ajustarla a 10 mg/ml con H₂O inyectable.

SDS AL 20%

NaCl 5M 14.6grs en 50 ml