



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LOS POLIMORFISMOS DE CYP1A1 Y CYP2E1  
EN LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS EN UNA  
POBLACIÓN MESTIZA DE TLAXCALA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KAREN SUÁREZ LARIOS



DOCTORA REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

2008



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.

## Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Suárez Larios Karen 57 11 28 96 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301008235</p>
<p>2. Datos del tutor Dra Regina Dorinda Montero Montoya</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra Rosario Rodríguez Arnaiz</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr Luis Felipe Jiménez García</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra Julieta Rubio Lightbourn</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dr Víctor Manuel Dávila Borja</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Efecto de los Polimorfismos de CYP1A1 y CYP2E1 en la Frecuencia de Micronúcleos en una Población Mestiza de Tlaxcala 74 p 2008</p>

*Quiero dedicar este trabajo a todas aquellas personas e instituciones que fueron una parte fundamental durante la elaboración de este trabajo:*

*A la UNAM, a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biomédicas por brindarme la posibilidad de completar mi formación académica y profesional, además de permitirme llevar a cabo este proyecto.*

*Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT, y nuevamente a la UNAM por el apoyo económico que me dieron para continuar y concluir este trabajo de forma satisfactoria a través del proyecto No. IN220506, con nombre: Determinación de riesgo de daño genotóxico debido a los polimorfismos metabólicos CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 y GSTT1, en individuos expuestos a la contaminación causada por plantas industriales en la zona limítrofe de los estados de Tlaxcala y Puebla.*

*A la Doctora Regina Montero, una asesora siempre dispuesta a ayudar a la elaboración de esta investigación y que fue uno de los pilares principales durante el desarrollo y conclusión de la misma.*

*A todos mis profesores por todo el tiempo que me dedicaron.*

*A Víctor Manuel Dávila por sus consejos que fueron y siguen siendo muy valiosos para mí.*

*A Antonio Araujo que fue un guía indispensable durante la parte experimental y que siempre estuvo dispuesto a ayudar en todo momento.*

*A Diana Soriano, Betzabé Nieto, Luis Serrano y Javier Belmont por los ánimos que siempre me dieron para seguir adelante.*

*A todos los miembros de Laboratorio y compañeros que siempre me echaron porras.*

*A mis padres por todo el apoyo que me brindaron aún durante aquellos momentos que más lo necesité y que soportaron mis momentos de locura.*

*A mis hermanas que me dieron ánimos para seguir adelante dándome siempre buenos consejos y palabras de aliento.*

*Y a todas aquellas personas que, aunque no menciono, pusieron un granito de arena que se apreciaba.*

***Pensamientos:***

*“Todos los hombres sueñan, mas no de la misma manera: aquellos que, gracias a los empolvados receptáculos de la mente, sueñan durante la noche, comprueban al despertar, llegada la mañana, que todo era fantasía. Pero los soñadores de día son hombres peligrosos, porque pueden llevar a efecto sus sueños, hacerlos posibles con los ojos abiertos...”*

**T.E. Lawrence: *Seven Pilars of Wisdom***

*“¿Hay algo más importante que la ciencia de la vida para cualquier ser inteligente que tenga la suerte de estar vivo?”*

**Isaac Asimov (1988)**

*“A mayores conocimientos científicos, mayores preocupaciones”*

**John Clarke, Clérigo anglonorteamericano (1609-1676)**

*“La ciencia no tiene a la vida por objeto; vemos poco, muy poco, y sólo podemos conjeturar lo que hay detrás”*

**Samuel Johnson, poeta inglés (1709-1784)**

*“El valor de una idea radica en su éxito”*

**Dewey, John (1859-1952)**

*“Si un mundo real trae consecuencias prácticas para la vida tendrá significado”*

**James, William (1842-1910)**

*“Pueden prohibirme seguir mi camino, pueden intentar forzar mi voluntad. Pero no pueden impedirme que, en el fondo de mi alma, elija a una o a otra”*

**Henrik Ibsen (1828-1906)**

*“... hasta que podamos encontrar nuestra próxima concha, es absolutamente necesario que volvamos a la concha que ocupamos ahora...”*

**Youka Nitta: *Haru wo Daite Ita***

## Abreviaturas

ATSDR*	Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades
pb	Pares de bases
BrdU*	Bromodesoxiuridina
CAFI	Células con una Alta Frecuencia de Intercambios
CYP1A1	Enzima Citocromo P450 1A1
<i>CYP1A1</i>	Gen de Citocromo P450 1A1
<i>CYP1A1*2C</i>	Polimorfismo <i>Ile/Val</i> en CYP1A1
CYP2E1	Enzima Citocromo P450 2E1
<i>CYP2E1</i>	Gen de Citocromo P450 2E1
CYP450	Enzima Citocromo P450
Céls >1MN	Células con más de un micronúcleo
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
DHHS*	Departamento de Salud y Servicios Humanos
dNTPs*	Desoxinucleótidos trifosfatos
DNA*	Ácido desoxirribonucleico
EPA*	Agencia de Protección Ambiental
GL	Grados de Libertad
<i>GSTT1*0</i>	Glutación Transferasa T1 nulo
HA*	Ácido hipúrico
H-W	Hardy-Weinberg
IARC*	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
IRIS*	Sistema de Información de Riesgo Integrado
IUPAC*	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>Ile</i>	Isoleucina
LD*	Desequilibrio de enlace
MN	Micronúcleos
MPCRB	Amortiguador para PCR con una concentración de 2mM de MgCl <sub>2</sub>

MVOCs*	Compuestos Orgánicos Volátiles Microbianos
2-NAP	2-naftol
8-OH-dG	8-hidroxidesoxiguanosina
1-OHP	1-hidroxipireno
PAHs*	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
RFLP*	Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos de Restricción
U	Unidad
VOCs*	Compuestos Orgánicos Volátiles
<i>Val</i>	Valina
X	Por ciento

\* Por sus siglas en inglés

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	2
Contaminación ambiental y Riesgo para la Salud.....	2
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos, PAHs.....	3
Compuestos Orgánicos Volátiles, VOCs.....	8
Biomarcadores.....	12
Micronúcleos.....	16
Metabolismo de Xenobióticos.....	16
Biotransformación de Xenobióticos.....	18
Polimorfismos en Enzimas Metabólicas.....	21
Citocromo P450.....	22
Superfamilia CYP450.....	22
<i>CYP1A1</i> .....	24
<i>CYP2E1</i> .....	25
Lugar de estudio.....	27
<b>Planteamiento del Estudio</b> .....	30
<b>Hipótesis</b> .....	31
<b>Objetivos</b> .....	31
<b>Material y Métodos</b> .....	32
Características de los Donadores.....	32
Reactivos.....	32
Buffer de Reacción MPCRB.....	32
Oligonucleótidos.....	32
Extracción de DNA.....	32
Amplificación de un fragmento de la región no codificante 5' de <i>CYP2E1</i> .....	33
Determinación de los Polimorfismos de <i>CYP2E1</i> dados por las enzimas de restricción <i>RsaI</i> y <i>PstI</i> .....	33
Amplificación de un fragmento que contiene el exón 7 de <i>CYP1A1</i> .....	33
Determinación del polimorfismo <i>Ile/Val</i> .....	34
Análisis de MN.....	34
Análisis estadístico.....	34



<b>Resultados.....</b>	<b>35</b>
1. Determinación de los genotipos para los polimorfismos <i>Pst</i> I y <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> .....	35
2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos <i>Pst</i> I y <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> .....	36
3. Determinación de los genotipos para el polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i> .....	38
4. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i> .....	39
5. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> y <i>CYP1A1*2C</i> combinados.....	40
6. Correlación entre la frecuencia de MN y los polimorfismos de <i>CYP2E1</i> y <i>CYP1A1</i> ....	40
6.1 Correlación entre la frecuencia de células >1MN y los polimorfismos <i>Pst</i> I y <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> .....	41
6.2 Correlación entre la frecuencia de células >1MN y el polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i> .....	42
6.3 Correlación entre la frecuencia de células >1MN y los polimorfismos combinados <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> y <i>CYP1A1*2C</i> .....	43
<b>Discusión.....</b>	<b>44</b>
Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos <i>Pst</i> I y <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> y del polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i> en mestizos de Tlaxcala.....	44
^^ 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos <i>Pst</i> I y <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> .....	44
^^ 2. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i> .....	47
Correlación entre la frecuencia de células >1MN y los polimorfismos de <i>CYP2E1</i> y <i>CYP1A1</i> .....	51
^^ 1. Correlación entre la frecuencia de células >1MN con los polimorfismos <i>Pst</i> I y <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> .....	51
^^ 2. Correlación entre la frecuencia de células >1MN con el polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i>	53
^^ 3. Correlación entre la frecuencia de células >1MN con los polimorfismos <i>Rsa</i> I de <i>CYP2E1</i> y <i>CYP1A1*2C</i> combinados.....	54
<b>Conclusiones.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>56</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>59</b>

## Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son compuestos que han sido asociados con el desarrollo de enfermedades y distintos tipos de cáncer debido al efecto mutagénico y carcinogénico que pueden presentar. Los micronúcleos (MN) son biomarcadores de efecto biológico que reflejan riesgos de daño genético en personas expuestas a agentes mutagénicos. Diversos tipos de sustancias químicas pueden actuar por sí mismos como compuestos tóxicos o carcinogénicos; o bien, al ser metabolizadas por enzimas como CYP450, se pueden producir metabolitos altamente reactivos, capaces de interactuar con componentes celulares como proteínas, lípidos y con el DNA y generar daño. Los PAHs y los VOCs son metabolizados, principalmente, por las enzimas de fase I, como CYP1A1 y CYP2E1 respectivamente. Varios estudios han demostrado el papel de ambas enzimas en la activación de mutágenos y carcinógenos al estudiar su actividad en modelos *in vitro* e *in vivo*. A su vez se ha observado que la variabilidad genética en las poblaciones determina una susceptibilidad individual como la descrita para enzimas de fase I que pueden mostrar incrementos en la actividad o, por el contrario, disminuirla, y que pueden estar asociados a un daño relacionado con procesos patológicos como la carcinogénesis. En *CYP1A1* se han reconocido varios polimorfismos de este tipo: el sitio polimórfico AA, *m1*, *m2* o *Ile/Val*, y *m4*; mientras que en *CYP2E1*, se reconocen los polimorfismos *DraI*, *RsaI*, *PstI*, *TaqI* y la inserción de 96 pb, entre otros. Con todo lo anteriormente mencionado, se puede conjuntar en un solo estudio el análisis de micronúcleos y asociarlo a la presencia de los polimorfismos *PstI* y *RsaI* de *CYP2E1* y el polimorfismo *CYP1A1\*2C* utilizando como grupo de estudio a pobladores de comunidades que se localizan a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac, contaminados con una gran cantidad de agentes químicos debido a la presencia de complejos industriales que tienen efectos en la salud de los habitantes. Los individuos de estas comunidades muestran una alta frecuencia de micronúcleos en linfocitos de sangre periférica en la presencia del genotipo nulo de *GSTT1*. Para este estudio, los donadores son habitantes de nueve comunidades establecidas a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac en el estado de Tlaxcala. Por medio de la técnica de PCR/RFLP se obtuvieron los genotipos de los polimorfismos *RsaI* y *PstI* de *CYP2E1* y el polimorfismo *CYP1A1\*2C*, se calcularon las frecuencias alélicas de los alelos mutantes y, mediante una prueba de Regresión Robusta, se correlacionaron cada uno de los tres polimorfismos estudiados, así como la combinación de los polimorfismos *PstI/RsaI* y *RsaI;CYP1A1\*2C*, con la frecuencia de a) células con un MN, b) células con más de un MN y c) células con uno o más MN, datos que fueron obtenidos anteriormente (Montero, et al, 2006). Las frecuencias de las variantes alélicas dentro de la población de estudio fueron de 0.235 para el polimorfismo *PstI*, de 0.324 para el polimorfismo *RsaI* y de 0.574 para el polimorfismo *CYP1A1\*2C*. Los polimorfismos *PstI* y *RsaI* se encontraron estrechamente ligados y en desequilibrio de enlace. También se encontró que los portadores de la variante alélica de los polimorfismos *PstI* y *RsaI* presentan una menor frecuencia de MN, mientras que el polimorfismo *CYP1A1\*2C* no presentó ninguna relación.

# INTRODUCCIÓN

## Contaminación ambiental y riesgo para la salud

El creciente descuido en la emanación y desecho de sustancias tóxicas al ambiente en nuestro país ha provocado que en los últimos años el estudio de los efectos que pueda tener sobre la salud humana se haya vuelto prioritario.

Los contaminantes en el ambiente, pueden encontrarse en su forma líquida o gaseosa, o formando partículas; ya sea en mezclas o solos, su origen puede ser natural, antropogénico o ambos.

Una sustancia química al ser liberada por una planta industrial o de un contenedor como una pila o una botella, entra al ambiente como una emisión química ya sea al aire, al agua o al suelo. A partir de cualquiera de estos medios es que un individuo puede entrar en contacto con ella para que ocurra la exposición. Dicha exposición puede darse al respirar, comer o beber sustancias que contengan a la sustancia química o por el contacto con la piel (Fig. 1).

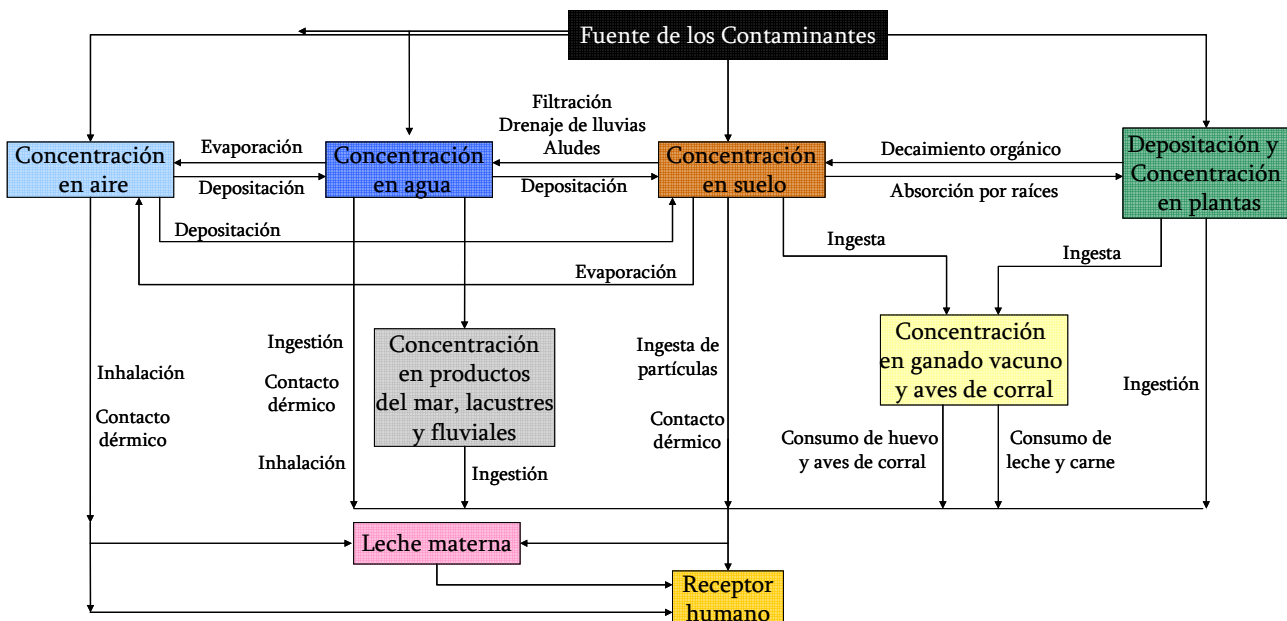


Figura 1. Representación de las rutas y vías potenciales por las que un contaminante puede entrar en contacto con el humano y darse la exposición. *Modificado de Derelanko y Kollinger, 2002*

Sin embargo, aún cuando se esté expuesto a sustancias tóxicas como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, PAHs (por sus siglas en inglés) y/o los compuestos orgánicos volátiles, VOCs (por sus siglas en inglés), las consecuencias para la salud estarán moduladas por diversos factores. Estos factores incluyen la dosis (cantidad de la sustancia), la duración (cuánto tiempo se está expuesto), la vía por la cual se da la exposición (respiración, ingestión, bebida, o por contacto por la piel), las características físico-químicas de los agentes tóxicos, otros compuestos químicos a los cuales se esté expuesto (mezclas), las condiciones laborales y características individuales como la edad, género, estatus nutricional, rasgos hereditarios, estilo de vida y estado de la salud (Fig. 2) (ATSDR, 1995; Derelanko y Kollinger, 2002).

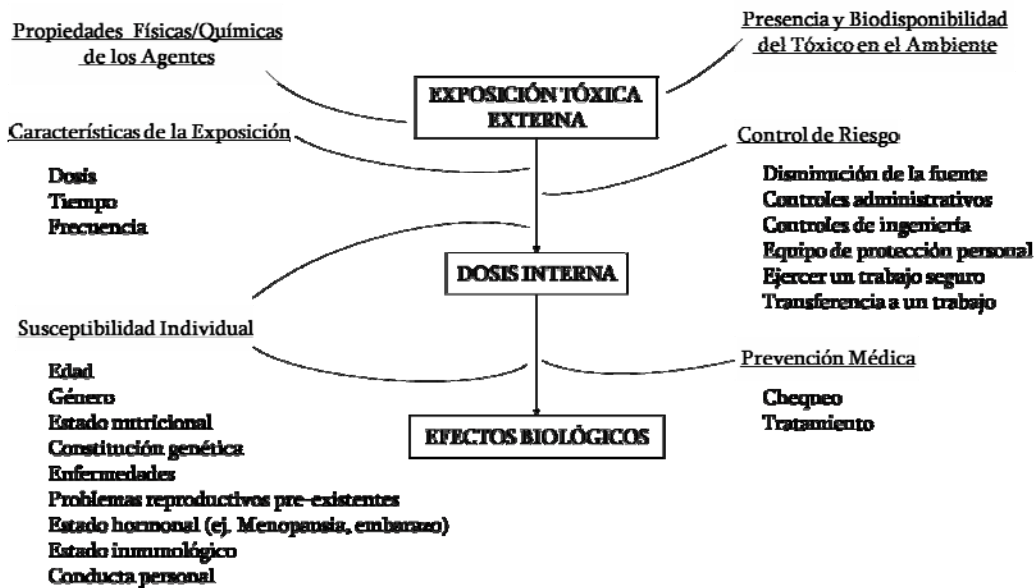


Figura 2. Factores que influyen en el riesgo que presenta un individuo por exposición a xenobióticos. *Modificado de Derelanko y Kollinger, 2002.*

## Hidrocarburos aromáticos policíclicos, PAH's

De manera general, en un proceso de combustión eficiente, el carbón del combustible es oxidado a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el hidrógeno a vapor de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) y el azufre a dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ); sin embargo, en una combustión incompleta, se pueden formar productos incompletos y/o inquemados como hidrocarburos no quemados ( $\text{CH}$ ), y liberarse carbono ( $\text{C}_2$ ), hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) y monóxido de carbono ( $\text{CO}$ ) (Lippmann et al. 2003). Este tipo de combustión se presenta por diversas condiciones tales como la falta de oxígeno ( $\text{O}_2$ ), mezclas pobres de combustible y aire, niveles extremadamente altos de aire, la extinción de flama con paredes frías, reducción de la temperatura durante la combustión, menor combustión por el tiempo de residencia de un gas y reducción de carga (por ejemplo, disminución en la intensidad de la combustión) (EPA, 1993).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son un grupo de sustancias químicas diferentes que se forman por reacciones a alta temperatura como combustiones incompletas y pirólisis de combustibles fósiles y otros materiales orgánicos (Ho y Lee, 2002); ejemplo de ello es la combustión incompleta del carbón, petróleo, gasolina, gas, madera, basura y otras sustancias orgánicas como el tabaco y carne cocinada a la parrilla (ATSDR, 1996).

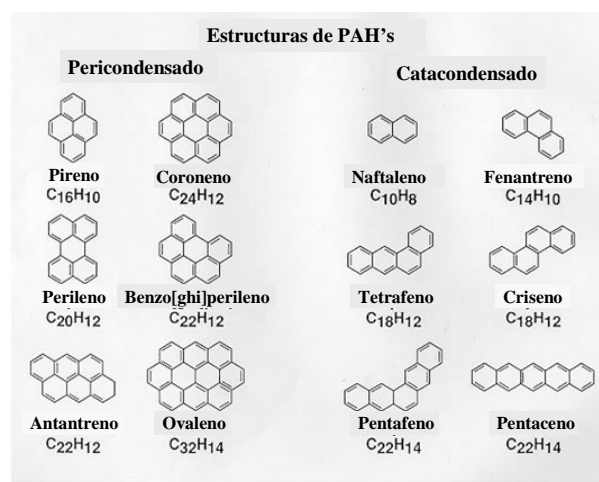


Figura 3. Estructuras químicas de diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs).

Los PAHs son una clase de moléculas orgánicas muy estables formadas por carbono e hidrógeno. Estas moléculas son planas en donde un átomo de carbono está unido a tres átomos de carbono más, como en el grafito y en los cuales dos o más anillos bencénicos se encuentran fusionados (Albert, 1990) (Fig. 3). Existen más de 100 tipos diferentes de PAHs; sin embargo, no todos han sido completamente estudiados y, por ende, no se tiene suficiente información de los efectos que puedan tener en la salud, pero de aquellos que se tiene información, se sabe que los efectos que tienen sobre ésta no son exactamente los mismos.

En la tabla 1 se presentan aquellos PAHs de los cuales existe una mayor información disponible y que se ha observado en algunos casos puedan tener efectos nocivos en la salud humana. Aún cuando los PAHs se forman durante la pirólisis y la combustión incompleta, estos también se pueden localizar en el alquitrán, petróleo crudo, creosota, asfalto, brea y alquitrán para techado, aunque algunos son utilizados en medicamentos o en la fabricación de tintes, plásticos y pesticidas: generalmente se encuentran como una mezcla de dos o más de estos compuestos como el hollín. Así, la mayoría de estos compuestos se encuentran de forma natural en el petróleo y en el carbón y, en menor cantidad, cuando se produce algún incendio forestal o de pastizales debido a tormentas y por actividad volcánica; sin embargo, algunos son manufacturados como compuestos individuales para investigación, pero las mezclas encontradas en los productos de combustión no pueden ser sintetizadas. Los PAHs puros generalmente son sólidos incoloros, blancos o amarillos verdosos pálidos. (ATSDR, 1995; ATSDR, 1996).

La movilización de los PAHs en el ambiente depende de las propiedades de cada uno de ellos, como qué tan fácilmente se disuelven en el agua y qué tan fácilmente se evaporan en el aire; así, pueden encontrarse en el aire, en el agua, en la tierra o incluso en los mismos seres vivos según las condiciones que se presenten (ATSDR, 1996). En general, mientras menor sea el peso molecular y mayor sea la polaridad de un hidrocarburo, mayor será su solubilidad en el agua, por lo que los hidrocarburos aromáticos son menos solubles que los hidrocarburos lineales; por otra parte, la evaporación de hidrocarburos de bajo peso molecular (12 átomos de carbono o menos) es mucho mayor que la de hidrocarburos de alto peso molecular (Albert, 1990).

A continuación se presenta la forma en la que los PAHs pueden llegar a los diferentes medios:

- a) Aire. Estos compuestos orgánicos pasan al aire principalmente por las emisiones volcánicas, incendios forestales, combustión del carbón, la quema de madera en los hogares y los gases del tubo de escape de los automóviles y camiones, y pueden encontrarse en forma de vapores, aunque también se ha observado que pueden encontrarse adheridos a partículas de polvo; sin embargo, ciertas partículas de PAHs pueden evaporarse fácilmente del suelo o de aguas superficiales. Algunos, pueden degradarse en productos de larga duración durante un periodo que dura días o semanas al reaccionar con la luz solar o con otras sustancias químicas presentes en el aire (ATSDR, 1996).
- b) Agua. Los PAHs pueden llegar a las aguas superficiales a través de las descargas producidas por plantas industriales y plantas de tratamiento de aguas residuales. La mayoría de estos compuestos no pueden disolverse fácilmente en el agua, aunque después de varias semanas o incluso meses, pueden ser degradados por microorganismos principalmente (ATSDR, 1995; ATSDR, 1996).

Tabla 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)



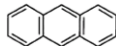
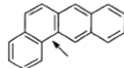
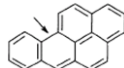
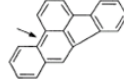
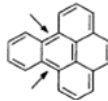
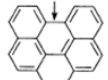
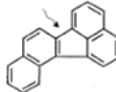
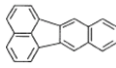
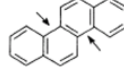
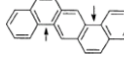
Nombre	Sinónimos	Fórmula química	Estructura química
Acenafteno	1,2-dihidroacenaftileno 1,8-dihidroacenaftalino 1.8-etilenaftaleno 1,2-dihidroacenaftileno	$C_{12}H_{10}$	
Acenaftileno	ciclopenta[d,e]naftaleno	$C_{12}H_8$	
Antraceno	antracín aceite verde paranaftaleno	$C_{14}H_{10}$	
Benzo[a]antraceno	BA benz[a]antraceno 1,2-benzantraceno benzo[b]-fenantreno 2,3-benzofenantreno tetrafeno	$C_{18}H_{12}$	
Benzo[a]pireno	benzo[d,e,f]criseno 3,4-benzopireno 3,4-benzpireno BP B[a]P	$C_{20}H_{12}$	
Benzo[b]fluoranteno	3,4-benz[e]acefenantrileno 2,3-benzfluoranteno 3,4-benzfluoranteno 2,3-benzofluoranteno 3,4-benzofluoranteno benzo[e]fluoranteno B[b]F	$C_{20}H_{12}$	
Benzo[e]pireno	1.2-benzopireno 1,2-benzpireno 4,5-benzopireno 4,5-benzpireno B[e]P	$C_{20}H_{12}$	
Benzo[g,h,i]perileno	1,12-benzoperileno	$C_{22}H_{12}$	
Benzo[j]fluoranteno	10,11-benzofluoranteno 12,13-fluoranteno dibenzo[a,j,k]-fluoreno 7,8-benzofluoranteno B[j]F	$C_{20}H_{12}$	
Benzo[k]fluoranteno	8,9-benzfluoranteno 8,9-benzofluoranteno 11,12-benzofluoranteno 2,3,1,8-binaftileno dibenzo[b,j,k]fluoreno	$C_{20}H_{12}$	
Criseno	1,2-benzofenantreno benzo[a]-fenantreno 1,2-benzfenantreno benz[a]fenantreno 1,2,5,6-dibenzonaftaleno	$C_{18}H_{12}$	
Dibenzo[a,h]antraceno	1,2:5,6-dibenz[a]antraceno dibenz[a]antraceno DB[a,h]A DBA	$C_{22}H_{14}$	

Tabla 1. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) ( <i>continúa</i> )			
Nombre	Sinónimos	Fórmula química	Estructura química
Fenantreno	Fenantreno Fenantrín	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	
Fluoranteno	1,2-[1,8-naftileno]benzeno 1,2-benzacenafteno 1,2-[1,8-naftalenedil] benzeno benzo[j,k]fluoreno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	
Fluoreno	Orto-bifenileno metano difenilenometano 2,2-metileno bifenil 2,3-benzideno	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	Indenopireno IP Orto-fenileno pireno 1,10-[orto-fenileno]pireno 1,10-[1,2-fenileno]pireno 2,3-orto-fenileno pireno	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	
Pireno	benzo[d,e,f]fenantreno 8-pireno	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	

— "Bay region". Presente cuando el PAH tiene un anillo terminal y la oxidación metabólica de este anillo terminal es un paso crucial en la activación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Ortiz de Montellano et al. 1997)

- c) Suelo. En este caso, es probable que los PAHs se adhieran firmemente a las partículas permaneciendo como sólidos en el suelo o en sedimentos, a través de los cuales pueden ser transportados y contaminar mantos freáticos. Estos compuestos pueden llegar al suelo de los sitios de desechos peligrosos si se escapan de contenedores de almacenamiento, a través de pesticidas, derrame de combustibles fósiles e, incluso, a través de la lluvia cargada con estos compuestos en suspensión. Al igual que en el caso del agua, existen microorganismos que pueden degradarlos después de varias semanas o meses (ATSDR, 1995; ATSDR, 1996).
- d) Organismos. Los PAHs pueden acumularse en plantas acuáticas y terrestres, peces, invertebrados acuáticos y animales terrestres; muchos animales pueden metabolizar y eliminar estos compuestos. Los PAHs que se acumulan en los organismos acuáticos provienen del agua, de los sedimentos y de comida contaminados por estos compuestos. Algunas plantas terrestres pueden tomar los PAHs del suelo a través de sus raíces o del aire a través de su follaje, mientras que los PAHs pueden acumularse en animales terrestres a través de la cadena alimenticia o por ingestión de suelo (ATSDR, 1996).

En la actualidad, las personas pueden estar expuestas a estos compuestos al respirar aire contaminado y que son producidos por plantas que procesan coque, alquitrán y asfalto, o en aquellos lugares donde se quema basura o se ahúman productos; la exposición puede ser laboral o ambiental, cuando las personas viven cerca del lugar. Los trabajadores pueden estar expuestos a los PAHs a través de la inhalación de gases de los tubos de escape de motores y/o al utilizar productos que contienen PAHs provenientes de industrias como la minera, refinadoras de petróleo, la metalúrgica (como las plantas de producción de aluminio), producción de compuestos químicos, la industria eléctrica y el transporte. También al respirar aire con PAHs del humo del cigarro, de la combustión de madera, de emisiones del escape de los automóviles, caminos de asfalto, o humo de la combustión de productos agrícolas. De igual forma se exponen a los PAHs al estar en contacto

con aire, agua o suelo cerca de sitios de residuos peligrosos y desechos de fábricas, así como la incineración de carbón, madera, gasolina u otros productos y de residuos industriales y municipales. En el hogar se puede estar expuesto a estos compuestos a través del humo del cigarro, en los productos de madera tratados con creosota, al ingerir carnes preparadas en parrillas o que se han quemado, granos, cereales, harina, pan, hortalizas, frutas o carnes contaminadas, así como alimentos procesados o en escabeche e, incluso, al beber leche o agua contaminadas y a través de la leche materna cuando la madre se ha expuesto a estos compuestos orgánicos. Los alimentos cultivados en suelos contaminados o en atmósferas contaminadas también presentan PAHs (ATSDR, 1995; ATSDR, 1996).

En el aire de áreas rurales se han encontrado niveles de referencia de algunos PAHs representativos que oscilan entre 0.02 y 1.2 ng/m<sup>3</sup>, mientras que en áreas urbanas se han detectado niveles entre 0.15 y 19.3 ng/m<sup>3</sup>. Por otra parte, se ha encontrado la presencia de PAHs en el agua potable, cuyo rango oscila entre 4 y 24 ng/L. En la dieta típica en EU, el nivel de PAHs es menor a 2 µg/kg de alimentos (ATSDR, 1995).

Los PAHs son contaminantes ambientales omnipresentes y muchos de ellos, actualmente, son conocidos como compuestos mutágenos y/o carcinógenos; estos últimos se han asociado con partículas atmosféricas. Estos compuestos pueden sufrir una descomposición térmica, reaccionar con distintos compuestos químicos presentes en la atmósfera y formar otro tipo de compuestos que pueden ser incluso más tóxicos que los compuestos originales (Ho y Lee, 2002).

Los PAHs pueden ser perjudiciales para la salud humana. Se ha observado que PAHs como el benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-c,d]pireno pueden causar tumores en animales de laboratorio (ATSDR, 1996). Por ejemplo, se ha observado que en ratones, la exposición a altas concentraciones de benzo[a]pireno, causa problemas en fertilidad, defectos de nacimiento y bajo peso corporal; efectos similares se podrían presentar en humanos, pero no se dispone de información que pueda demostrar dichos efectos. También en animales se ha visto que los PAHs pueden ocasionar efectos nocivos en la piel, fluidos corporales, y en la habilidad para combatir infecciones después de la exposición, tanto a corto como a largo plazo (ATSDR, 1995; ATSDR, 1996).

Por otra parte, estudios realizados en seres humanos han demostrado que personas expuestas a través de la respiración o por contacto con la piel durante largos períodos de tiempo a mezclas que contienen PAHs y otros compuestos también pueden desarrollar cáncer (ATSDR, 1996).

Por esta razón, diversas organizaciones y agencias se han encargado de determinar cuáles son aquellos PAHs que podrían actuar como agentes carcinógenos mediante la elaboración de estudios tanto en humanos como en animales. En la tabla 2 se presentan algunos ejemplos de estos compuestos:



**Tabla 2. Clasificación de algunos PAHs según su efecto carcinogénico (ATSDR, 1995)**

Hidrocarburo Aromático Policíclico (PAH)	Carcinógenos animales	Probables carcinógenos humanos	Posibles carcinógenos humanos	No carcinógenos humanos	No clasificado según sus efectos carcinógenos
Acenafteno					✓1, 2, 3
Acenaftileno				✓3	
Antraceno			✓2*	✓3	
Benzo[a]antraceno	✓1	✓2, 3			
Benzo[b]fluoranteno	✓1	✓3	✓2		
Benzo[j]fluoranteno	✓1		✓2		
Benzo[k]fluoranteno	✓1	✓3	✓2		
Benzo[a]pireno	✓1	✓2, 3			
Benzo[e]pireno				✓2	
Benzo[g,h,i]perileno				✓2, 3	
Criseno	✓1	✓3	✓2*		
Dibenzo[a,h]antraceno	✓1	✓3			
Fluoranteno				✓2, 3	
Fluoreno				✓2, 3	
Fenantreno				✓2, 3	
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	✓1	✓3	✓2		
Pireno				✓2, 3	

<sup>1</sup> Departamento de Salud y Servicios Humanos

<sup>2</sup> Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)

<sup>3</sup> Agencia de Protección Ambiental (EPA)

\* Recientemente la IARC lo ha registrado como posible carcinógeno humano (IARC, 2007)

## Compuestos orgánicos volátiles, VOCs

Acorde a la definición otorgada por la Comisión de las Comunidades Europeas, los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son todos aquellos compuestos que poseen una presión de vapor igual o mayor de 0.075 mmHg, a una temperatura de 20°C, o que tengan una volatilidad correspondiente bajo una condición particular (IUPAC, 2000). Otros autores describen a los VOCs como un grupo diverso de compuestos orgánicos que tiene la propiedad de permanecer evaporados en un cuarto a temperatura ambiente (Kim, et.al., 2005), por lo que se incluyen diversas clases de compuestos químicos orgánicos con distinto grado de volatilidad y liposolubilidad, y son empleados en grandes cantidades en la industria, en el transporte y en el ámbito doméstico (Moreno, 2003).

Uno de los usos que se les ha dado a los VOCs es como disolventes, siendo éstos definidos como sustancias químicas orgánicas de pequeño tamaño molecular que se encuentran en estado líquido, con una lipofilia y una volatilidad variables y que carecen de carga eléctrica, por lo que se clasifican principalmente según su estructura molecular o su grupo funcional, abarcando sus diferentes categorías a los hidrocarburos alifáticos, muchos de los cuales son clorados, los hidrocarburos aromáticos, alcoholes, éteres, ésteres, acetatos, amidas y aminas, aldehídos, cetonas y diferentes tipos de mezclas complejas de difícil clasificación (Klaassen y Watkins III, 2006).

De la misma manera, si se definiera a los VOCs con base en su presión de vapor, diferentes clases de compuestos químicos con diversa solubilidad y perfil tóxico cubrirían este término (IUPAC, 2000). En la tabla 3 se presentan algunos VOCs representativos y más estudiados.

Los VOCs son emitidos como gases de ciertos sólidos o líquidos ([www.epa.gov/iaq/voc.html](http://www.epa.gov/iaq/voc.html)) que incluyen numerosos disolventes, halogenados y no halogenados, y son empleados en múltiples

usos: agentes desengrasantes, pesticidas, lacas, tintes, aerosoles, materiales de construcción, reactivos para síntesis química, combustibles y aditivos; también pueden liberarse por equipos de oficinas, como copiadoras e impresoras, correctores y papel para copia sin carbón, materiales gráficos y para arte incluidos pegamentos y adhesivos, marcadores permanentes y soluciones fotográficas; en el hogar se utilizan en barnices, pinturas y ceras, todo lo que contiene disolventes orgánicos como productos de limpieza, desinfectantes, cosméticos, desengrasantes y para recreación ([www.epa.gov/iaq/voc.html](http://www.epa.gov/iaq/voc.html)); algunos VOCs pueden ser ingeridos en pequeñas dosis por consumo de agua clorada (Moreno, 2003).
























Tabla 3. Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs)				
Tipo de sustancia	Nombre	Sinónimos	Fórmula química	Estructura química
Hidrocarburos aromáticos	Benceno	benzol 1,3,5-ciclohexatrieno	$C_6H_6$	
	Tolueno	metilbenceno fenilmetano toluol	$C_7H_8$	
	<i>o</i> -Xileno	1,2-dimetilbenceno <i>o</i> -xilol ortoxileno	$C_8H_{10}$	
	<i>m</i> -Xileno	1,3-dimetilbenceno <i>m</i> -xilol metaxileno	$C_8H_{10}$	
	<i>p</i> -Xileno	1,4-dimetilbenceno <i>p</i> -xilol paraxileno	$C_8H_{10}$	
	Etilbenceno	etilbenzol EB feniletano	$C_8H_{10}$	
	Estireno	feniletano vinil benceno estirol etenilbenceno estiroleno	$C_8H_8$ o $C_6H_5CH:CH_2$	
Hidrocarburos alifáticos	N-Hexano	hexano	$C_6H_{14}$	
Alcoholes	Metanol	hidroximetano alcohol metílico alcohol de madera carbinol	$CH_3OH$	
	Etanol	alcohol etílico alcohol de grano hidroxietano EtOH	$C_2H_5OH$	

Tabla 3. Compuestos Orgánicos Volátiles (VOCs) (continúa)				
Tipo de sustancia	Nombre	Sinónimos	Fórmula química	Estructura química
Hidrocarburos clorados	Tetracloruro de carbono	cloruro de carbono tetracloruro de metano perclorometano tetraclorometano tetrasol	$\text{CCl}_4$	
	Diclorometano	cloruro de metileno	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	
	Clorobenceno	cloruro de benceno monoclorobenceno cloruro de fenilo	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	
	Tricloroetileno	1,1,2-tricloroetileno tricloroeteno tricloruro de etileno	$\text{C}_2\text{HCl}_3$ $\text{ClCC}=\text{CCl}_2$	
	Tetracloroetileno	tetracloroeteno percloroetileno perc PCE	$\text{C}_2\text{Cl}_4$	
	Cloroformo	Triclorometano metano triclorado R-20	$\text{CHCl}_3$	
Aldehídos	Formaldehído	metanal formalin formol metil aldehído óxido de metileno	$\text{HCHO}$ $\text{CH}_2\text{O}$	
Cetonas	Acetona	propanona β-cetopropano dimetil cetona	$\text{CH}_3\text{COCH}_3$	
	2-Butanona	etilmetilcetonona metilpropanona metil etil cetona	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ $\text{CH}_3\text{COC}_2\text{H}_5$	
Ésteres de ácidos carboxílicos	Acetato de etilo	etanoato de etilo etil éster Acetato de etilo éster acético éster de etanol	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	
Glicoles y éteres glicólicos	Étilenglicol	etano-1,2-diol etileno glicol monoetileno glicol MEG 1,2-etanediol	$\text{HOC}_2\text{H}_4\text{OH}$	
	Propilenglicol	propane-1,2-diol propileno glicol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$ $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OH}$	
Amidas	Dimetilformamida	N,N-dimetilmetanamida DMF N,N-dimetilformida DMFA	$\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$ $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$	

Adicionalmente, algunos VOCs pueden ser generados por algunos microorganismos como los hongos, mohos, bacterias, y protozoos que contribuyen con innumerables especies químicas,

algunas de las cuales son usadas como marcadores de contaminación. Los olores mohosos pueden deberse a los subproductos del metabolismo microbiano o de la degradación de organismos y de los sustratos sobre los cuales crecen. Las clases y el número de VOCs microbianos (MVOCs) son muchas. El tipo de sustancia depende del organismo u organismos específicos involucrados, las condiciones del cultivo en cuanto a sustrato, humedad, temperatura y nutrientes disponibles. Los mohos comunes que crecen en una variedad de medios de cultivo, bajo condiciones controladas, producen patrones de MVOCs dependientes en gran medida de la composición del medio (Derelanko y Hollinger, 2002). Los MVOCs son liberados directamente en el aire y, dado que estos compuestos tienen a menudo olores fuertes y/o desagradables, pueden ser la fuente de los olores asociados a los mohos. Por otra parte, la exposición a los MVOCs de los mohos ha sido ligada a síntomas como dolores de cabeza, irritación nasal, mareo, fatiga y náuseas; sin embargo, la investigación sobre los MVOCs aún está en fase temprana, por lo que no se conocen los efectos nocivos que puedan tener sobre la salud humana (EPA, 2001).

Los VOCs se volatilizan cuando los productos de los cuales forman parte (como propulsores de aerosoles, aguarrás, limpiadores, entre otros) son empleados para los fines previstos; así como también puede liberarse a través de fugas de disolventes durante las actividades de producción, procesado, almacenamiento y transporte (Klaassen y Watkins, 2003). Al ser de carácter no iónico y tener un peso molecular bajo, son buenos candidatos para la absorción por todas las vías de interés ambiental: ya sea por ingestión, por inhalación y por vía cutánea (Moreno, 2003). Además son un grupo importante de contaminantes ambientales que producen serios problemas de contaminación del aire: en primer lugar, se ha demostrado que estos compuestos son muy activos en la formación de smog fotoquímico y niveles altos de producción de ozono, generando la llamada *contaminación oxidante*. Y en segundo lugar, varios VOCs encontrados en aire urbano han sido clasificados como compuestos carcinogénicos (1,3-butadieno y benceno) (Ho y Lee, 2002; Moreno, 2003).

Las concentraciones atmosféricas de varios VOCs son usualmente muy bajas; no obstante, se han registrado altas concentraciones de estos compuestos en algunas áreas urbanas, principalmente alrededor de plantas petroquímicas y en áreas inmediatas a las zonas de almacenaje de residuos peligrosos (Klaassen y Watkins III, 2003). Además, son emitidos al aire a partir de depósitos de desechos industriales mal construidos o en lotes expuestos al aire libre, por lo que también pueden contaminar el aire de comunidades que se encuentran aledañas (Moreno, 2003).

Por si fuera poco, los VOCs, por el uso tan extendido que se les da como disolventes, pueden contaminar todos los medios, alcanzando una distribución muy amplia: los abastecimientos de agua potable, el suelo, el aire al evaporarse a partir del agua o del suelo, y al ser moderadamente solubles en agua, pueden filtrarse hasta las fuentes de agua subterránea, de tal forma que aún aquellas personas que no los usan o están en contacto directo con ellos, podrían verse expuestos; todo lo anterior los convierte en un problema sanitario cuya importancia va en aumento. Una vez que un VOC penetra en una masa de agua, su concentración disminuye rápidamente como consecuencia de la dilución y la evaporación, principalmente. En el caso de las aguas superficiales, según su densidad, los VOCs ascienden hacia la superficie, en donde se evaporan en su mayor parte, o se hunden hasta el fondo en donde, para alcanzar la superficie, los VOCs dependerán de su hidrosolubilidad o de la mezcla por la acción de las corrientes o las olas. Los compuestos que llegan a las aguas subterráneas quedan atrapados hasta que el agua alcanza la superficie (Klaassen y Watkins III, 2006).

En estudios elaborados por la EPA (Environmental Protection Agency, USA) se ha encontrado que los niveles de contaminantes orgánicos son de 2 a 5 veces más altos dentro de los hogares que fuera de ellos, ya sea en áreas rurales o en áreas altamente industrializadas; de igual manera se ha

reportado que las personas que emplean productos con compuestos orgánicos se exponen a sí mismas y a otras a niveles altos de contaminantes que pueden persistir en el aire a concentraciones elevadas aún después de finalizar la actividad (EPA, 2007). Pequeñas diferencias en la estructura química pueden traducirse en diferencias considerables en cuanto a la toxicidad. La mayoría de los VOCs provocan narcosis e irritación en la piel y en las mucosas, dolor de cabeza, pérdida de la coordinación, náuseas, daño al hígado, riñón y al sistema nervioso central. Algunos VOCs pueden causar cáncer en los animales, de algunos se sospecha que puedan causar cáncer en humanos y sólo unos cuantos se encuentran clasificados como carcinógenos para el ser humano (Klaassen y Watkins III, 2006; [www.epa.gov/iaq/voc.html](http://www.epa.gov/iaq/voc.html)). Igual que en el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los VOCs están siendo estudiados por organizaciones y agencias para determinar cuáles representarían un riesgo de carcinogénesis para los humanos. En la siguiente tabla se presenta la clasificación que se le ha dado a algunos de los VOCs, según su efecto carcinogénico en animales o humanos, por parte de tres agencias de importancia: EPA, IARC y DHHS (Tabla 4).

**Tabla 4. Clasificación de algunos VOCs más representativos por su efecto carcinogénico según la DHHS, la IARC y la EPA.**

Compuesto Orgánico Volátil (VOC)	Carcinógeno reconocido	Carcinógenos humanos conocidos	Probables carcinógenos humanos	Posibles carcinógenos humanos	No clasificable como carcinógeno humano	No clasificado según sus efectos carcinógenos
Acetato de etilo						✓3
Acetona						✓1b, 3a
Benceno	✓1	✓2,3				
2-Butanona					✓1b	✓3*
Clorobenceno					✓3	✓2*
Cloroformo	✓1a		✓3	✓2		
Diclorometano	✓1a		✓3	✓2		
Dimetilformamida					✓2	✓3
Etanol		✓2a				
Etilbenceno				✓2	✓3	
Etilenglicol						✓1b, 3
Estireno				✓2b		✓3*
Formaldehído	✓1a	✓2	✓3			
n-Hexano						✓1b, 3b
Metanol						✓3*
Propilenglicol						✓1b, 3
Tetracloroetileno	✓1a		✓2			✓3*
Tetracloruro de carbono	✓1a		✓3	✓2		
Tricloroetileno			✓2			✓3*
Tolueno					✓2	✓3a
Xileno					✓2	✓3b

<sup>1</sup> Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) (ToxFAQs 2001b, 2005a)

<sup>1a</sup> Puede ser anticipado como carcinógeno (ToxFAQs 1987a, 1987c, 1989a, 2001a, 2005b)

<sup>1b</sup> Tanto la DHHS como la IARC (ToxFAQs 1985a, 1985b, 1987b, 1989b, 2007)

<sup>2</sup> Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 1987, 1989a, 1989c, 1989d, 2000, 2004)

<sup>2a</sup> El etanol es considerado un carcinógeno humano en bebidas alcohólicas. (IARC, 1988)

<sup>2b</sup> Aunque la información es inadecuada para evaluar la carcinogenicidad, la IARC los ha clasificado como no carcinógenos en humanos (IARC, 1989b).

<sup>3</sup> Agencia de Protección Ambiental (EPA) (IRIS 1987a, 1987b, 1987c, 1987d, 1988, 1989, 1990, 1991a, 1991b, 1991c, 1991d, 1991e, 1991f, 1995, 2000, 2001, 2003a, 2003c, 2005b)

<sup>3a</sup> Anteriormente la EPA lo tenía clasificado como no carcinógeno humano; sin embargo, actualmente se determinó que la información para conocer su potencial carcinógeno es inadecuada, por lo que se no lo puede clasificar (IRIS 2003b, 2005a; ATSDR 1995, 2001)

<sup>3b</sup> Información inadecuada para su clasificación.

\* No se hace referencia sobre la carcinogenicidad del compuesto.

## Biomarcadores

Uno de los retos principales de la toxicología ambiental es relacionar la presencia de una sustancia química en el ambiente con el peligro que representa para los organismos expuestos al evaluar sus efectos tóxicos. Las consecuencias nocivas en la salud inician con la exposición al contaminante y su posterior evolución al deterioro o alteración de la función de un organelo, de una célula o de un tejido del organismo que ha entrado en contacto directo o indirecto con la sustancia tóxica. Anteriormente, el riesgo ambiental era valorado mediante la medición de los residuos químicos en muestras ambientales y la comparación con los efectos tóxicos que se observaban en las especies en contacto con dichos compuestos, o bien, se determinaban los niveles de una o más sustancias tóxicas presentes en los organismos y se relacionaban con los efectos perjudiciales sobre los mismos (Klaassen y Watkins III, 2006; Manahan, 2003); sin embargo, debido a factores como las alteraciones bioquímicas de los compuestos tóxicos, las correlaciones entre los niveles en el ambiente y los efectos tóxicos observados son a menudo imposibles de lograr (Manahan, 2003).

En la actualidad, las medidas de exposición y efecto pueden ser cuantificadas en una variedad de niveles de organización biológica (molecular, celular, sistemas, individuos, poblaciones y cualquier comunidad biótica) (Derelanko y Hollinger, 2002) en donde los biomarcadores han llegado a formar una parte importante para dicha cuantificación y han permitido obtener una mejor aproximación en la correlación de niveles de compuestos tóxicos y sus efectos.

El término biomarcador se utiliza lo más ampliamente posible para abarcar “cualquier respuesta biológica a un producto químico a nivel de individuo, o por debajo de él (molecular, celular, sistemas), demostrando una desviación del estado normal”, por lo que abarca mediciones bioquímicas, fisiológicas, histológicas, morfológicas y de sobrevivencia (Derelanko y Hollinger, 2002).

En general, un biomarcador es una característica que es medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos, o como respuestas a una intervención terapéutica (Biomarkers Definitons Working Group *Bethesda, Md*, 2001). Sin embargo, en la toxicología, los biomarcadores consisten en alteraciones observables y/o medibles de componentes, estructuras, procesos o conductas biológicos, atribuibles a la exposición a sustancias xenobióticas, y a menudo se utilizan animales y otros organismos para inferir los peligros de los productos químicos en humanos (Manahan, 2003). También son ampliamente utilizados en la evaluación de los efectos tóxicos y/o acumulativos que los productos químicos pueden tener en la biota (*in situ*), por ejemplo, en la evaluación de riesgos ecológicos, los biomarcadores son usados para evaluar la integridad de un ecosistema. Los biomarcadores también juegan un papel importante en la evaluación de la eficacia que tienen las acciones de remediación en un caso de contaminación (Derelanko y Hollinger, 2002).

El aumento de la información acerca de las enfermedades causadas por sustancias químicas en una especie permite disponer de un mayor número de biomarcadores específicos y útiles que pueden extrapolarse a otras especies. Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconocen los mecanismos exactos por los que un compuesto tóxico provoca un daño, lo que hace necesario emplear indicadores específicos de enfermedad (Klaassen y Watkins III, 2006).

Para seleccionar biomarcadores de forma apropiada y según el tipo de estudio que se vaya a realizar, hay factores importantes que deben de ser considerados puesto que pueden afectar el resultado; éstos incluyen sensibilidad de las especies, condiciones fisiológicas, rasgos del comportamiento, tiempo, índice y frecuencia de la exposición al compuesto químico en el ambiente; así como caracterizar los efectos directos e indirectos (Derelanko y Hollinger, 2002).

## Tipos de biomarcadores

La exposición a una concentración suficiente de una sustancia tóxica puede producir en el organismo una gran variedad de respuestas que pueden evolucionar hacia una enfermedad; dichos eventos inician con la exposición interna, seguido del establecimiento de la dosis interna y de la llegada al lugar crítico, en donde se producen alteraciones reversibles o irreversibles que desembocan en situaciones patológicas (Klaassen y Watkins III, 2006). Por lo que los biomarcadores pueden ser clasificados dentro de tres categorías principales: a) de susceptibilidad, b) de exposición o c) de efecto, según el evento que estén indicando.

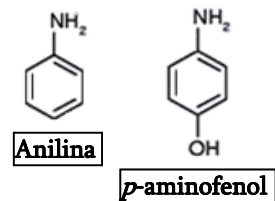
### Biomarcadores de susceptibilidad

Los biomarcadores de susceptibilidad son criterios de valoración que indican la presencia de una alteración bioquímica o fisiológica, lo que se relaciona con incrementos en la vulnerabilidad de los organismos a una enfermedad, un ataque físico (como a bajas temperaturas), o ataques químicos por parte de otras sustancias químicas. Los biomarcadores de susceptibilidad más comunes son aquellos que están asociados con fallas en el sistema inmune (inmunosupresión), que puede incrementar la susceptibilidad de los organismos a enfermedades infecciosas o a parásitos, e inclusive hacerlos más susceptibles a enfermedades como el cáncer (Manahan, 2003; Klaassen y Watkins III, 2006); la falta de nutrientes y los rasgos genéticos heredados también son ejemplos de biomarcadores de susceptibilidad y entre los que se pueden mencionar a los polimorfismos genéticos de los que se hablará más adelante.

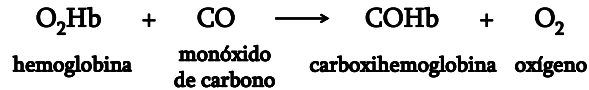
### Biomarcador de exposición.

Un biomarcador de exposición consiste en la medición de la dosis interna de un xenobiótico, de sus metabolitos y/o de una diana molecular o celular, o de un efecto directamente atribuible a tal sustancia en el organismo. Los xenobióticos o sus metabolitos pueden ser medidos directamente en tejidos obtenidos de una biopsia o de una necropsia en orina, sangre, aire exhalado, heces y leche; la ventaja de este tipo de marcadores es que algunos pueden ser tomados en repetidas ocasiones sobre un periodo de tiempo (Manahan, 2003; Klaassen y Watkins III, 2006).

Un ejemplo de biomarcador de exposición en humanos es la anilina, ya que se pueden medir las concentraciones de su metabolito *p*-aminofenol en sangre o en orina. También se pueden analizar los cuerpos de Heinz, debidos a la precipitación de la hemoglobina y que son producidos por la anilina, en eritrocitos de sangre periférica.



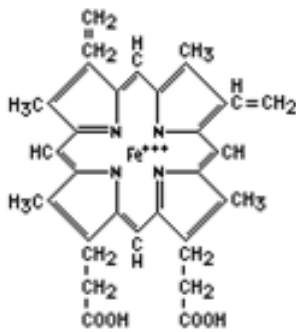
Los compuestos causantes de cáncer y los metabolitos carcinógenos son generalmente especies electrofílicas (atraídas hacia zonas ricas de electrones) que pueden causar cambios genéticos y bioquímicos que conducen al cáncer por adición a grupos nucleofílicos (átomos ricos en electrones, como el nitrógeno y el oxígeno) localizados en biomoléculas, particularmente en el DNA, formando así complejos conocidos como aductos. Una clase particularmente útil de biomarcador usado con mayor frecuencia en los últimos años son los aductos de xenobióticos o sus metabolitos, con biomoléculas. Un ejemplo directo de la medición de un aducto usado durante muchos años como evidencia de exposición es la carboxihemoglobina, COHb, producido cuando el monóxido de carbono inhalado se incrementa en la hemoglobina de la sangre. Hb:



En general, los biomarcadores de exposición se utilizan para establecer la dosis recibida por un individuo, la cual se trata de relacionar con las alteraciones que dan lugar al estado patológico (Klaassen y Watkins III, 2006).

### Biomarcador de efecto

Los biomarcadores de efecto son alteraciones fisiológicas, bioquímicas, o de conducta, que son directamente atribuibles a la exposición a sustancias químicas y que, dependiendo de su magnitud, se identifican como un trastorno de la salud o una enfermedad potencial o definida.



**Methemoglobina**

Como se mencionó anteriormente, la exposición a anilina puede ser determinada por su medición o la de *p*-aminofenol en sangre, pero también puede medirse por la producción de methemoglobina en la sangre (un producto de hemoglobina inservible para acarrear oxígeno en sangre en donde el hierro (II) de la hemoglobina ha sido oxidado a hierro (III)). La exposición a sustancias como gas nervioso, organofosfatos, insecticidas organofosfatados, e insecticidas carbamatos que inhiben la enzima colinesterasa requerida para la función nerviosa, puede ser determinada por la medición de la actividad de esta enzima. La exposición al metabolito del DDT, EL *p,p'*-

DDE puede ser medido en ratas de laboratorio (*Rattus rattus*) por inducción de la enzima de citocromo P-4502B, una enzima involucrada en la desintoxicación de xenobióticos.

Dentro de los biomarcadores de efecto se pueden encontrar también los biomarcadores citogenéticos que son alteraciones citogenéticas que pueden observarse en la sangre periférica; ejemplo de ello son las aberraciones cromosómicas, los intercambios de cromátidas hermanas y los micronúcleos. Estas alteraciones citogenéticas han sido usadas durante muchos años como biomarcadores de exposición a genotóxicos en humanos y como biomarcadores de efecto temprano en el proceso carcinogénico, ya que pueden proveer información útil para la detección temprana de los efectos por una exposición a un carcinógeno y la predicción de un riesgo a padecer cáncer.

La razón principal por la cual se usa este tipo de pruebas es el hecho de que la mayoría de los carcinógenos humanos conocidos son genotóxicos en pruebas a corto plazo, siendo capaces de inducir daño cromosómico como aberraciones cromosómicas o micronúcleos. En un estudio controlado y bien diseñado de trabajadores expuestos ocupacionalmente, el incremento en la frecuencia de alteraciones citogenéticas es generalmente considerado como indicio de exposición a carcinógenos genotóxicos lo que permite sugerir la necesidad del establecimiento de medidas de protección. Además, hay estudios epidemiológicos que sugieren que una alta frecuencia de aberraciones cromosómicas predice un incremento en el riesgo a cáncer (IARC, 2004).

La determinación de biomarcadores citogenéticos en estudios de susceptibilidad individual ha sido aplicada en investigaciones de individuos expuestos a agentes genotóxicos conocidos o potenciales (Ishikawa et al. 2004).



## Micronúcleos (MN)

La presencia de micronúcleos (MN) es uno de los marcadores más sensibles de daño al DNA y ha sido usado en la investigación de la genotoxicidad producida por varios compuestos químicos. Al usar células en interfase, la presencia de MN se considera como un biomarcador citogenético más recomendable para esta clase de estudios, que los intercambios de cromátidas hermanas y las aberraciones cromosómicas, debido a que no está limitado a células en metafase, además permite hacer una rápida revisión de un gran número de células (Ishikawa et al. 2004); el inconveniente con este tipo de biomarcador es poco específico, es decir, no nos permite conocer el tipo de agente que produce el daño o en que lugar está sucediendo, sobre todo cuando hablamos a nivel de genes, pero a cambio de ello, los MN son muy informativos ya que se pueden inducir en condiciones de estrés oxidante, exposición a clastógenos y aneúgenos, defectos genéticos en los retenes del ciclo celular y/o reparación del DNA, así como deficiencias en nutrientes requeridos como cofactores en el metabolismo del DNA y en la maquinaria de la segregación cromosomal. Todos estos eventos pueden causar la formación de MN a través de rearrreglos cromosómicos, expresión de genes alterada, aneuploidía o efectos asociados con el fenotipo de inestabilidad cromosómica que puede observarse después en el cáncer (Bonassi et al. 2006).

Los MN son pequeños núcleos adicionales que están formados por cromosomas enteros con una o ambas cromátidas, por cromosomas acéntricos o por fragmentos de una cromátida que se han retrasado en la anafase/telofase del ciclo celular y han sido excluidos de ambos núcleos de las células hijas, por lo que la prueba de MN parece ser una buena herramienta para investigar los efectos de clastógenos y aneuploidógenos en exposiciones ambientales y ocupacionales (Ishikawa et al 2004; IARC, 2004).

En humanos, los MN son usualmente detectados en cultivos de linfocitos de sangre periférica que se marcan de alguna forma para poder identificar a las células que proliferaron en un cultivo, ya sea por el método de bloqueo de la citocinesis o por marcaje con bromodesoxiuridina (BrdU). Los MN producidos por exposiciones *in vivo* pueden ser analizados también en células epiteliales exfoliadas, tales como las de las mucosas bucal, nasal y de vejiga. La presencia de fragmentos o de cromosomas enteros en MN puede ser identificada por la técnica de hibridación *in situ* con sondas pancentroméricas (IARC, 2004).

Se ha demostrado que existen factores que producen una variación de micronúcleos intra e interindividualmente. Tales factores pueden ser demográficos (edad y género) y habituales (beber o fumar). Se ha demostrado que la edad afecta la frecuencia de los biomarcadores citogenéticos, pero en los micronúcleos es debida a que los cromosomas sexuales son expulsados al aumentar la edad, tanto en hombres como en mujeres (Bukvic et al. 2001; Catalán et al. 2006; Ishikawa et al. 2004; IARC, 2004).

Por otra parte, numerosos estudios epidemiológicos han indicado que los polimorfismos en genes de enzimas metabólicas juegan un papel importante como factores que explican la dispersión de la distribución de MN en una población (Ishikawa et al. 2004).

## Metabolismo de xenobióticos

La disposición de una sustancia dentro del organismo, comprende diversos procesos como la absorción, distribución, biotransformación y excreción; los cuales se llevan a cabo dependiendo de la vía de administración, de los órganos que intervengan y de las características de la sustancia (Tabla 5).

Tabla 5. Principales vías de administración y de excreción, así como órganos y tejidos que participan en los procesos de absorción, distribución y almacenamiento de sustancias químicas				
Vías de administración	Absorción	Distribución	Almacenamiento	Excreción
Ingestión	Tubo digestivo	Sangre	Hígado	Urinaria
Inhalación	Pulmones	Líquido	Riñones	Fecal
Dérmica	Piel	Extracelular	Tejido adiposo	Biliar
Intravenosa			Hueso	Exhalación
Intraperitoneal				Secreciones
Subcutánea				
Intramuscular				

La unión de la sustancia química a otros compuestos o su disolución en determinados constituyentes corporales puede alterar considerablemente su distribución y, por otra parte, a menudo muchos compuestos tóxicos llegan a depositarse en tejidos u órganos, sean o no su lugar de acción, en donde conforme van siendo biotransformados o excretados se van liberando de los lugares en que se encuentran almacenados. En el siguiente esquema se presentan las diferentes vías de absorción, distribución y excreción que puede recorrer un xenobiótico a través del cuerpo.

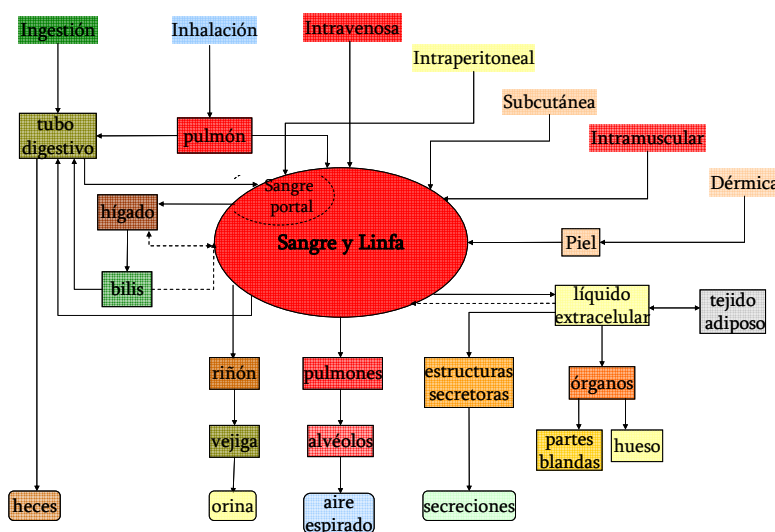


Figura 6. Vías de absorción, distribución y excreción de las sustancias tóxicas en el cuerpo. Fuente: Klaassen y Watkins III, 2006.

La toxicidad producida por un compuesto químico en el organismo, depende en mucho de la dosis, y la concentración de dicho compuesto en el lugar donde actúa. Diferentes factores pueden afectar los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción de las sustancias, siendo algunos ejemplos los siguientes: 1) si la fracción o la velocidad de absorción son bajas, la sustancia nunca alcanzará una concentración lo suficientemente alta como para causar toxicidad en un posible blanco de acción; 2) la distribución de una sustancia química puede hacer que ésta se concentre en un tejido que no es la diana, ocasionando la disminución de la toxicidad; 3) la biotransformación de un compuesto químico puede originar la formación más o menos rápida de metabolitos de menor o mayor toxicidad, teniendo consecuencias obvias para la concentración, y

por lo tanto para la toxicidad, en el lugar de acción, y 4) cuanto más rápido se elimine una sustancia química del organismo, menor será la concentración y por ende su toxicidad en el tejido o tejidos afectados.

La piel, los pulmones y el tubo digestivo son las barreras principales que separan a los organismos superiores de un medio que contiene una gran variedad de sustancias químicas, con excepción de los productos cáusticos y corrosivos (ácidos, bases, sales oxidantes) que actúan por vía tópica. Cuando una sustancia es absorbida, el torrente sanguíneo la distribuye a todo el cuerpo, hasta alcanzar un órgano o tejido blanco. Una diana puede ser afectada por uno o más compuestos químicos y un compuesto químico puede tener más de una diana, lo que puede incrementar el daño que produzca en el organismo.

Los compuestos químicos son eliminados de la circulación mediante la biotransformación, la excreción y el depósito en distintas zonas del cuerpo. La contribución relativa de estos procesos a la eliminación total dependerá de las características físicas y químicas del compuesto. El riñón, junto con los pulmones y el hígado, desempeña una función fundamental en la eliminación de la mayoría de los compuestos tóxicos, pero el órgano más activo en la biotransformación de las sustancias es el hígado. La biotransformación suele ser un requisito para la excreción renal, ya que muchos compuestos son liposolubles y, para poder ser excretados por los riñones, se requiere su transformación en productos hidrosolubles.

La sensibilidad de los órganos a uno o más compuestos tóxicos también depende de factores como:

- a) Potencia y especificidad del compuesto tóxico.
- b) Velocidad de absorción *vs.* velocidad de eliminación. Si la velocidad de absorción supera la velocidad de eliminación, se corre el riesgo de que los compuestos tóxicos comiencen a acumularse y alcanzar una concentración crítica en su lugar de acción dando lugar a la toxicidad.
- c) Relación toxicidad-concentración del compuesto tóxico en el órgano o tejido blanco. En este caso, no importa si la sustancia se ha administrado o se ha producido por biotransformación en el órgano o tejido blanco o en otra zona lejana.
- d) Disponibilidad del compuesto tóxico en el organismo. Algunos productos químicos tienen toxicidad inherente, pero su biotransformación puede generar metabolitos que ejercerán los efectos farmacodinámicos o tóxicos para el organismo y la respuesta tóxica dependerá de la velocidad de producción y de la concentración de los metabolitos, en este caso se dice que hay una activación de un compuesto o metabolito tóxico. Sin embargo, la mayoría de las veces la biotransformación inactiva rápidamente a un compuesto que tiene una alta toxicidad por sí mismo y pone fin a los efectos farmacológicos de un principio activo y disminuye la toxicidad de los xenobióticos; en este caso se dice que hay una bioinactivación o desintoxicación, en donde los metabolitos son menos dañinos o no son tóxicos para el organismo (Fig. 7) (Klaassen y Watkins III, 2006).

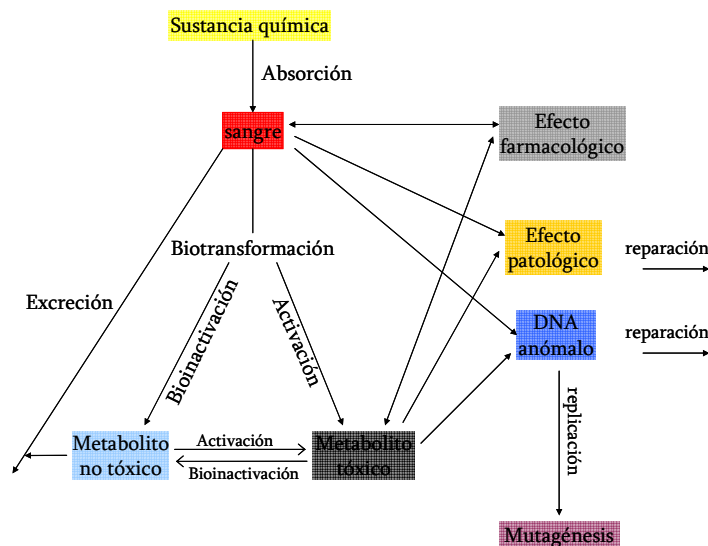


Figura 7. Representación esquemática de la disposición y los efectos tóxicos de las sustancias químicas. *Modificado de Klaassen y Watkins III, 2006.*

## Biotransformación de xenobióticos

La mayoría de los compuestos xenobióticos que entran al organismo son altamente liposolubles, característica que favorece su absorción. Durante su biotransformación, estos compuestos son transformados en compuestos más polares y solubles en agua, lo que favorece su excreción en orina o heces principalmente, aunque también es posible su eliminación por medio del sudor, lágrimas, semen y secreciones vaginales, que pueden actuar como medios de excreción; por ejemplo, algunos compuestos volátiles pueden ser eliminados por medio de la exhalación.

Las enzimas metabolizadoras de xenobióticos son las encargadas de llevar a cabo el proceso de biotransformación y se encuentran en todos los tejidos, siendo el hígado el que presenta una mayor concentración de éstas. Se les encuentra en varios compartimentos subcelulares y en los vertebrados, aparte del hígado, se localizan en la piel, los pulmones, la mucosa nasal, los riñones, los ojos, el tubo digestivo y muchos más tejidos (Tabla 6). Además, la microflora intestinal participa de forma importante en la biotransformación de algunos xenobióticos. (Derelanko y Hollinger, 2002; Klaassen y Watkins III, 2003).

**Tabla 6. Localización y cantidad relativa de enzimas que metabolizan xenobióticos en algunos tejidos (fuente: Derelanko y Hollinger, 2002)**

Cantidad relativa	Tejido
Alta	Hígado
Media	Pulmón, riñón, intestino
Baja	Piel, testículos, placenta, adrenales
Muy baja	Tejidos del sistema nervioso

En su mayoría, estas enzimas presentan una especificidad amplia por varios sustratos, por lo que la biotransformación de los compuestos químicos sucede de manera competitiva. La mayoría de estas enzimas son constitutivas, es decir, su síntesis se lleva a cabo sin la necesidad de un estímulo

externo discernible; sin embargo, algunas de estas enzimas se sintetizan en respuesta a la presencia del xenobiótico, a través de procesos de inducción de la enzima.

Las reacciones de biotransformación de xenobióticos en sistemas biológicos se llevan a cabo en dos fases principales: la Fase I, en la cual los xenobióticos la mayoría de las veces son modificados para posteriormente pasar a la Fase II en donde experimentan reacciones de conjugación con moléculas endógenas (Tabla 7). Las reacciones de la Fase I abarcan, principalmente reacciones de hidrólisis, reducción y oxidación, las cuales exponen o introducen grupos funcionales más polares que incrementan su hidrofilia; entre los grupos funcionales que se agregan se encuentran el carboxilo, el epóxido, el hidroxilo, el sulfhidrilo, el amina, el hidroxilamina y el imina. La mayoría de los metabolitos polares experimentan una conjugación a través de reacciones de Fase II, las cuales resultan en la introducción de grupos funcionales endógenos, que generan productos aún más polares y más fácilmente excretables. Los principales procesos de biotransformación de la Fase II son la glucuronidación, la sulfonación o sulfatación, acetilación, metilación, conjugación con glutatión y con aminoácidos tales como la glicina, la taurina y el ácido glutámico. Las enzimas que participan en ambas fases de la biotransformación se localizan principalmente en el retículo endoplásmico, y en el citosol, aunque también aparecen en menor cantidad en mitocondrias, núcleo y lisosomas (Tabla 8).

<b>Fase I</b>	<b>Fase II</b>
Oxidación	Glucuronidación
Reducción	Glucosidación
Hidrólisis	Sulfatación
Isomerización	Metilación
Otros	Acetilación
	Conjugación con aminoácido
	Conjugación con glutatión
	Conjugación con ácidos grasos
	Condensación

La modificación química de los xenobióticos que se produce por la biotransformación puede alterar sus efectos biológicos. Algunos fármacos que pasan por esta etapa se transforman en metabolitos activos que ejercen un efecto tóxico o farmacodinámico. Las enzimas que catalizan las reacciones de biotransformación a menudo determinan la intensidad y duración de la acción de un fármaco y son un factor clave en la toxicidad y la oncogénesis química. Algunos metabolitos producidos durante la Fase I son más reactivos que los compuestos originales y esto puede resultar en una unión covalente con blancos críticos conduciendo a la formación de compuestos tóxicos.

Sin embargo, las vías metabólicas también son afectadas por factores generales como las propiedades intrínsecas del compuesto químico, la dosis, la especie u organismo expuesto, raza, sexo y edad, así como otras consideraciones ambientales, como ya se había mencionado anteriormente (Derelanko y Hollinger, 2002; Klaassen y Watkins III, 2003).

**Tabla 8. Reacciones generales de biotransformación de xenobióticos, enzimas que intervienen en el proceso y su principal localización intracelular (modificado de Klaassen y Watkins III, 2006)**

REACCIÓN	ENZIMA	LOCALIZACIÓN
<i>Fase I</i>		
<i>Hidrólisis</i>	Esterasa	RE*, citosol, lisosomas
	Peptidasa	Lisosomas
	Epóxido hidrolasa	RE, citosol
<i>Reducción</i>	Reducción de grupos azo y nitro	Microflora, RE, citosol
	Reducción de grupos carbonilo	Citosol, RE
	Reducción de grupos disulfuro	Citosol
	Reducción de grupos sulfóxido	Citosol
	Reducción de grupos quinona	Citosol, RE
	Deshalogenación reductora	RE
	<i>Oxidación</i>	Alcohol deshidrogenasa
Aldehído deshidrogenasa		Mitocondria, citosol
Aldehído oxidasa		Citosol
Xantina oxidasa		Citosol
Monoamino oxidasa		Mitocondria
Diamina oxidasa		Citosol
Prostaglandina H sintasa		RE
Flavín monooxigenasas		RE
<b>Citocromo P-450</b>		RE
<i>Fase II</i>		
	Glucuronidación	RE
	Sulfatación	Citosol
	Conjugación con glutatión	Citosol, RE
	Conjugación con aminoácidos	Mitocondria, RE
	Acetilación	Mitocondria, citosol
	Metilación	Citosol, RE

\* RE, Retículo Endoplásmico

## Citocromo P450

Los citocromos P450 (CYP450) son enzimas cuyo sitio activo esta conformado por una protoporfirina IX, unida a un átomo de hierro a través de una cisteína. Este grupo de enzimas comenzó a ser estudiada a mediados del siglo XX y en 1964 los japoneses Tseo Omura y Ryo Sato confirman la naturaleza hemo-protéica de estas enzimas dándosele el nombre de Citocromos P450 por la peculiaridad de que su espectro de absorción en luz UV presenta un pico máximo a 450nm. Una vez identificado CYP450, numerosos estudios demostraron que esta proteína era una hidroxilasa microsomal hepática y su actividad enzimática es conocida por estudios de la biotransformación de fármacos. La concentración más alta intracelular de las enzimas CYP450 se encuentra en los microsomas del retículo endoplásmico.

CYP450 metaboliza muchos pasos de la biosíntesis de esteroides y participa en el metabolismo oxidante de ácidos grasos, esteroides, y otros sustratos endógenos. Sin embargo, dentro de la reacción de oxidación durante la Fase I, los CYP450 juegan un papel central en el metabolismo de una gran variedad de fármacos y en general de xenobióticos, pues llevan a cabo las reacciones de desintoxicación y bioactivación por lo que ocupan el primer lugar en cuanto a versatilidad catalítica y número de compuestos químicos que activan o inactivan. Este grupo de enzimas lleva a cabo las reacciones de oxidación: 1) Hidroxilación de un carbono alifático o aromático; 2) epoxidación de un enlace doble; 3) oxigenación de un heteroátomo (*S*-, *N*- e *I*-) y N-hidroxilación;

4) desalquilación de un heteroátomo (*O*-, *S*-, *N*- y *Si*-); 5) transferencia de un grupo oxidante; 6) escisión de ésteres y 7) deshidrogenación.

La presencia del grupo hemo en su sitio activo, permite a CYP450 introducir grupos hidroxilo en estructuras no reactivas como cadenas de hidrocarburos y anillos aromáticos, iniciando la biotransformación de compuestos que no poseen grupos funcionales requeridos para la conjugación. Además, estas enzimas son monooxigenasas, es decir, catalizan reacciones de oxigenación a partir de la molécula de O<sub>2</sub> oxígeno molecular y en presencia de cofactores, para transferir uno de los átomos del oxígeno al sustrato y el otro reducirlo a agua, mediante equivalentes reductores procedentes del NADPH (Josephy et al. 1997; Klaassen y Watkins III, 2006).

Debido a sus características, las enzimas de CYP450 pueden activar compuestos químicos que en ocasiones llegan a ser más dañinos que el compuesto original, por lo que pueden ser las responsables transformar varios tipos de xenobióticos a especies más reactivas mucho más tóxicas y/o carcinogénicas; de tal forma que se dice que los citocromos P450 son enzimas clave en la activación y eliminación de sustancias de importancia toxicológica y farmacológica (Josephy et al. 1997).

## **Superfamilia CYP450**

Diversos estudios han revelado la existencia de múltiples formas de CYP450 con diferencias en secuencias de aminoácidos, mecanismos enzimáticos, afinidad por sustratos, mecanismos de regulación y niveles de expresión en órganos y tejidos. Por ejemplo, los microsomas hepáticos de mamíferos contienen numerosas isoformas de CYP450, la mayoría con la capacidad de catalizar diferentes reacciones de oxidación, que en el caso de humanos se pueden presentar 15 o más isoformas de CYP450 diferentes.

De forma general, todas las enzimas de CYP450 se engloban en una superfamilia conocida con el mismo nombre y, cada enzima individualmente es identificada por el número de la familia a la que pertenece (cuando la secuencia idéntica es >40%), una letra que indica la subfamilia (según la identidad de la secuencia de los aminoácidos) y al final otro número, el cual la identifica como un miembro específico dentro de la subfamilia.

La función y regulación de CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 y CYP2E1 están muy bien conservadas entre los mamíferos, por lo que estas proteínas mantienen el mismo nombre en todos los mamíferos y, el resto de las enzimas CYP450 adoptan un nombre específico según la especie. Las diferentes isoformas de CYP450 pueden participar en el metabolismo de una gran diversidad de xenobióticos y, mientras algunos de estos xenobióticos son metabolizados exclusivamente por una isoforma, existen otros que pueden ser metabolizados por más de dos isoformas distintas (Tabla 9), lo cual dependerá en parte de la afinidad que tenga la enzima por el xenobiótico (Josephy et al. 1997; Klaassen y Watkins III, 2006).

La cantidad y la actividad de cada enzima de CYP450 en cada individuo dependerá de factores ambientales y genéticos. En ocasiones, la estructura de una enzima puede presentar variaciones interindividuales que no sólo afectan la cantidad y actividad de la enzima, sino que también puede producir diferencias en la velocidad de la reacción enzimática.

**Tabla 9. Ejemplo de xenobióticos activados por enzimas CYP450 de humanos (Fuente: Klaassen y Watkins III, 2006)**

CYP1A1	CYP2E1
Benzo[a]pireno y otros hidrocarburos aromáticos policíclicos	Acilonitrilo
	Benceno
<b>CYP1A2</b>	Carbamato de etilo
2-Acetilaminofluoreno	Cloroformo
4-Aminodifenilo	Cloruro de vinilo
2-Aminofluoreno	Dibromuro de etileno
2-Naftilamina	Diclorometano
NNK*	1,2-Dicloropropano
Paracetamol	Dicloruro de etileno
Productos de la pirólisis de los aminoácidos (DiMeQx, MelQx, Glu P-1, Glu P-2, IQ, Ph1P, Trp P-1, Trp P-2)	Estireno
Tacrina	Halotano
	N-Nitrosodimetilamina
<b>CYP2A6</b>	Paracetamol
N-Nitrosodietilamina	Tetracloruro de carbono
NNK*	Tricloroetileno
<b>CYP2B6</b>	<b>CYP3A4</b>
6-Aminocriseno	Aflatoxina B <sub>1</sub> y G <sub>1</sub>
Ciclofosfamida	6-Aminocriseno
Ifosfamida	Benzo[a]pireno, 7,8 dihidrodil
<b>CYP2C8, 9, 18, 19</b>	Ciclofosfamida
Ácido tienflico	Esterigmatocistina
Ácido valproico	Ifosfamida
<b>CYP2D6</b>	1-Nitropireno
NNK*	Paracetamol
	Senecionina
	Tris(2,3-dibromopropil) fosfato

\*NNK. 4-Metilnitrosamino-1-3-piridil-butanona, una nitrosamina específica del tabaco

## Polimorfismos en enzimas metabólicas

Dentro de los biomarcadores de susceptibilidad se encuentran los polimorfismos que pueden definirse como una característica Mendeliana o monogénica que existe en una población en al menos dos fenotipos y aparentemente en al menos tres genotipos. Un polimorfismo debe de contrastar con un a variante genética rara, la cual es arbitrariamente definida como una característica monogénica que se presenta en una población con una frecuencia de el 1%-2%, y usualmente con frecuencias mucho más bajas (Vogel y Motulsky, 1997).

La presencia de polimorfismos en las enzimas encargadas del metabolismo de xenobióticos puede llegar a ocasionar un cambio en los niveles de expresión y de actividad de la enzima (que puede deberse a una alteración en la estructura de la proteína que ocasione que la enzima incremente o disminuya su actividad, o bien, impedir que sea degradada o inducir esta acción) y, por ende, alterar el metabolismo de compuestos químicos carcinogénicos y generar un mayor o menor riesgo a la salud.

La incorporación del estudio de los polimorfismos metabólicos en estudios epidemiológicos es de importancia debido a por lo menos tres razones: a) la identificación de una subpoblación que sea más susceptible a una enfermedad inducida por compuestos químicos puede incrementar la importancia de los estudios; b) la sospecha del papel de un agente etiológico es reforzada por el conocimiento de la enzima implicada en su metabolismo y, 3) los polimorfismos pueden ser



particularmente significativos en relación a niveles bajos de exposición ya que pueden influir en el proceso de la evaluación de riesgo y en el establecimiento de límites tolerables de exposición que debería de tener en cuenta la susceptibilidad individual (Vineis et al. 1999). Además, el estudio de los polimorfismos permite conocer que alelo es el que va a dar una mayor susceptibilidad (si el alelo común o la variante alélica) a una población dependiendo del compuesto al cual esté expuesta y al efecto que tenga la variante alélica sobre la enzima (mayor o menor expresión, mayor o menor actividad, etc.).

## Polimorfismos en *CYP1A1*

El gen de *CYP1A1* en los seres humanos se encuentra ubicado en el cromosoma 15 cerca del locus MP1 en la región 15q22-24, está integrado por 7 exones y 6 intrones y su proteína está conformada por 512 residuos de aminoácidos. De acuerdo a su función principal, se considera una enzima extrahepática debido a que se ha reportado la presencia de mRNA y proteína en pulmón, linfocitos y placenta, en contraste a la ausencia de niveles detectables en la mayoría de los hígados humanos examinados. El producto del gen de *CYP1A1* es una hidrocarburo aromático hidroxilasa, enzima principal en el metabolismo de los PAHs como el benzo[a]pireno (Fig. 8) y el dimetilbenzantraceno, de los cuales anteriormente se mencionó que varios de ellos son considerados como carcinógenos humanos.

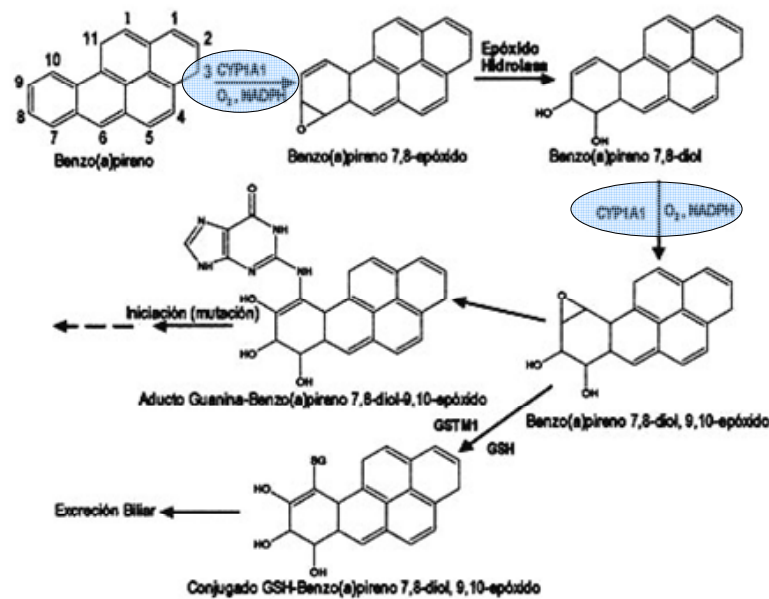


Figura 8. Metabolismo del benzo[a]pireno (modificado de Quiñones et al. 2006).

Varios polimorfismos han sido descritos en el gen de *CYP1A1*, entre los cuales resaltan el sitio polimórfico AA, *MspI* (o m1), *CYP1A1\*2C* (o m2 o polimorfismo *Ile/Val*), la mutación m3 descrita en poblaciones de negros africanos y m4, situada tan sólo dos bases río arriba de *CYP1A1\*2C* (Fig. 9); sin embargo, sólo los tres primeros han sido estudiados extensivamente en relación con la susceptibilidad a cáncer. Dos de ellos son polimorfismos genéticamente ligados, uno producido por el sitio de reconocimiento *MspI* en la región no codificante 3' y el otro, *CYP1A1\*2C*, producido por la transición de la base adenina a guanina en la base 4889 del exón 7; ambos han sido asociados con un incremento de riesgo a cáncer de pulmón inducido por fumar en asiáticos pero

no así en caucásicos. (Cascorbi et al. 1996; Vineis et al. 1999). Además, en los últimos años la variante alélica de *CYP1A1\*2C* ha sido asociada con un incremento al riesgo de distintos tipos de cáncer: de esófago en asiáticos (Wang et al. 2002; Wu et al. 2002; Yang et al. 2005), cáncer de mama en mujeres coreanas (Han, et al, 2004) y cáncer cervical en mujeres turcas (Taskiran et al. 2006); sin embargo, en americanas se asoció con una disminución de riesgo a cáncer endometrial (Doherty et al. 2005).

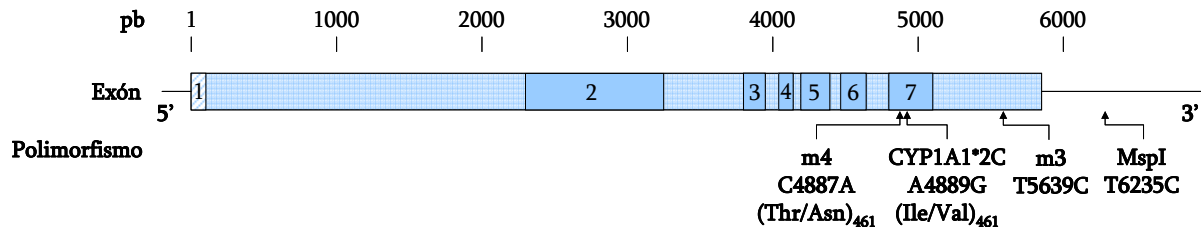


Figura 9. Organización estructural y sitios polimórficos en el gen *CYP1A1* de humanos.

Debido a que se han encontrado asociaciones entre el polimorfismo *CYP1A1\*2C* y algunos tipos de cáncer, en diversos estudios se ha tratado de correlacionar este polimorfismo con la presencia de distintos tipos de daño temprano mediante el uso de una gran cantidad de biomarcadores como metabolitos (Alexandrie et al. 2000; Lee et al. 2001a; Heuser et al. 2007), intercambio de cromátidas hermanas (Carere et al. 2002), micronúcleos (Ishikawa et al. 2004; Heuser et al, 2007), aductos (Hong et al. 2000; Lodovici et al. 2004), aberraciones cromosómicas (Paz y Miño et al. 2004), daño a DNA observado a través del ensayo cometa (Hoffman et al. 2005; Heuser et al. 2007; Novotna et al. 2007), daño en tejidos (Tsai et al. 2006), entre otros. Para corroborar el papel que juega *CYP1A1\*2C* como factor de susceptibilidad individual y prevenir el posible desarrollo de distintas enfermedades, en especial en aquellas personas que están expuestas, directa o indirectamente, a una gran cantidad de agentes tóxicos y evitar riesgos a la salud.

## Polimorfismos en *CYP2E1*

El gen de *CYP2E1* en los seres humanos se encuentra localizado en el cromosoma 10, en la región 10q2403-qter y, con 11413pb, está integrado por 9 exones y 8 intrones y codifica para una proteína de 493 aminoácidos. *CYP2E1* es una N-nitrosodimetilamina dimetilasa que se expresa principalmente en el hígado (Umeno et al. 1988; Piao et al. 2003). *CYP2E1* se encarga de metabolizar un gran número de compuestos con estructura química diferente, agrupados dentro de los VOCs, lo que indica que su sitio activo no se acopla a una estructura en particular, además de que los sustratos pueden no tener una alta afinidad por la enzima. Algunos sustratos de *CYP2E1* son hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno, xileno, estireno, etc.), hidrocarburos halogenados (tetracloruro de carbono, tricloroetileno, cloruro de vinilo, etc.), anestésicos halogenados, alcoholes, nitrosaminas, entre otros; la mayoría son compuestos tóxicos reconocidos y muchos de los cuales se vuelven más reactivos y, por ende más peligrosos, cuando son activados por *CYP2E1* (Fig. 10) (Vineis et al. 1999; Haufroid et al. 2002).

Mediante análisis de RFLP se han identificado varios polimorfismos en el locus de *CYP2E1*, esta técnica emplea enzimas de restricción para la identificación de variaciones de origen natural ocasionadas por cambios en un solo par de nucleótidos, o por deleciones o inserciones de uno o más pares de nucleótidos (Klug y Cummings, 1999). En la figura 11 se presentan los polimorfismos que han sido reportados a lo largo de la región no codificante (una inserción de DNA entre -1270 y

-1676pb, *PstI*, *RsaI*, *DdeI*), en los intrones (*DraI* y *TaqI*) y en los exones (*HlaI* en el exón 2 y en el exón 8) del gen de CYP2E1, los cuales han sido estudiados para ver su posible relación con la actividad de la enzima (Wu et al. 1997; Nomiyama et al. 2001; Haufroid et al. 2002; Teixeira et al. 2004; Ma et al. 2005; Qu et al. 2005). De éstos, los polimorfismos *PstI* (G-1259C) y *RsaI* (C-1019T) localizados en la región no codificante 5' del gen (Fig. 11), han sido de los más estudiados por su posible efecto en la actividad transcripcional del gen (Hayashi et al. 1991b; Watanabe et al. 1994) o en la actividad de la enzima (Lucas et al. 1996; Le Marchand et al. 1999). En los últimos años la asociación de estos polimorfismos con el desarrollo de cáncer o alguna enfermedad asociada a la actividad de CYP2E1 ha sido muy controversial; ya que en algunos estudios se han encontrado asociaciones positivas entre el alelo mutante de uno o ambos polimorfismos con cáncer de estómago (Gao et al. 2002) o incrementos en la patogénesis (Piao et al. 2003); otros han encontrado que portar el alelo mutante puede conferir una protección contra el desarrollo de cáncer de pulmón (Persson et al. 1993; Wu et al. 2002), gastrointestinal (Nishimoto et al. 2000), de esófago (Tan, et al, 2000) y, otros estudios más no han encontrado ninguna relación con cáncer (Wong et al. 2000) u otra enfermedad relacionada con el consumo de alcohol (Lee et al. 2001b; Vidal et al. 2004).

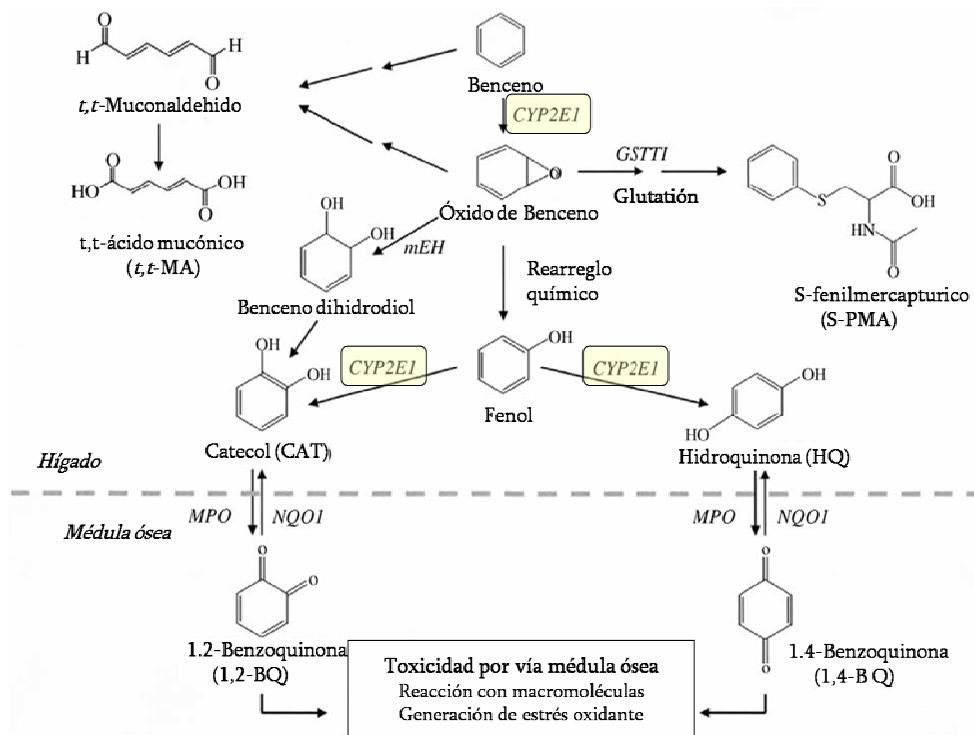


Figura 10. Metabolismo del benceno (modificado de Qu et al. 2005).

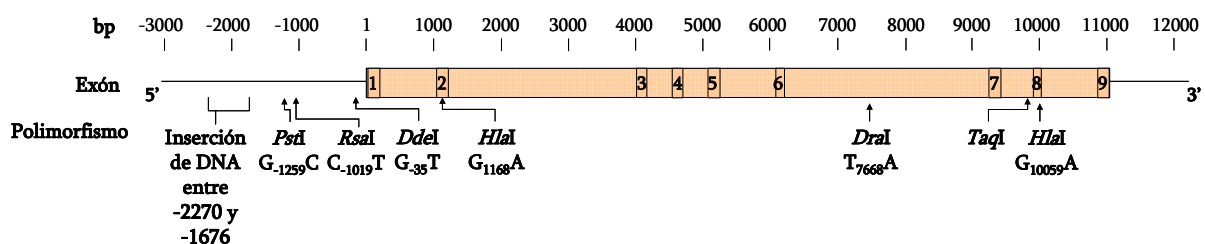


Figura 11. Organización estructural y sitios polimórficos en el gen *CYP2E1* de humanos.

Aún así, dado que ambos polimorfismos han sido asociados, ya sea positiva o negativamente con varias enfermedades y tipos de cáncer, se han diseñado estudios basados en la identificación de biomarcadores de exposición como metabolitos (Kawamoto et al. 1995; Lee et al. 2001a; Haunfroid et al. 2002; Fustinoni et al. 2005) o de daño como aductos (Hong et al. 2000), intercambio de cromátidas hermanas (Carere et al. 2002; Wong et al. 2003) y micronúcleos (Ishikawa et al. 2004; 2006), que permiten conocer su posible relación con la presencia de los polimorfismos de *CYP2E1* y así deducir el papel que juegan dentro del riesgo a la salud.

## Lugar de estudio

El estado de Tlaxcala, México, se encuentra en una situación de transición en la que las actividades rurales están siendo sustituidas por actividades industriales. El súbito asentamiento de corredores industriales en medio de una zona poco urbanizada y en donde los sistemas de alcantarillado no están separados de los sistemas municipales de las comunidades ha generado un deterioro ambiental importante en el aire y en las aguas de los ríos Atoyac y Xochiac que corren a lo largo de la zona. Se han encontrado sustancias químicas como cloroformo, cloruro de metileno, índigo, anilina y tolueno, producto de las descargas de las industrias y pequeñas lavanderías o maquiladoras de mezclilla situadas a lo largo de ambos ríos, así como aceites y grasas, además de los residuos orgánicos de origen doméstico (Tabla 10).

<b>Agente químico</b>	<b>Características</b>	<b>¿Es un carcinógeno humano?</b>	<b>Norma ambiental</b>
<b>Cloruro de metileno</b>	No se encuentra de forma natural. Se emplea como disolvente industrial, removedor de pintura y como loción limpiadora de metal. Se evapora fácilmente en el aire y su tiempo de vida es de 127 días.	Probable carcinógeno en humanos (IARC, grupo 2B)	No hay una norma
<b>Cloroformo</b>	Se usa en la producción de otros compuestos y puede formarse durante el tratamiento de agua con cloro. Se evapora fácilmente en el aire donde permanece durante mucho tiempo. También se filtra al agua subterránea.	Probable carcinógeno en humanos (IARC, grupo 2B)	No hay una norma
<b>Tolueno</b>	Es uno de los componentes de aceites y gasolinas. Se usa ampliamente en la producción de pinturas, lacas, adhesivos y caucho. Se filtra al agua subterránea.	No, sólo es neurotóxico y nefrotóxico (IARC, grupo 3)	No hay una norma
<b>Índigo y anilina</b>	Tintes naturales y sintéticos. El vapor de anilina es más pesado que el aire por lo que puede acumularse en áreas bajas. El vapor es combustible. La anilina tiene un olor característico aromático o a pescado que proporciona una buena advertencia de exposición aguda. La anilina se absorbe rápidamente después de la inhalación e ingestión. La anilina líquida y en vapor es absorbida también a través de la piel, lo que contribuye a una toxicidad sistémica.	La anilina es considerada como un probable carcinógeno en humanos (IARC, grupo 3)	No hay una norma

Habitantes de poblaciones que se distribuyen a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac, han denunciado la presencia de olores y aire irritantes que afectan los ojos, la garganta y causan dolor de cabeza, y se ha registrado la aparición de enfermedades como anemia, púrpura trombocitopénica y leucemia que los pobladores atribuyen a la contaminación de los ríos, la cual se observa por las manifestaciones del color azul, rojo o negro del agua y de los olores penetrantes por tiempos prolongados y de forma cotidiana.

Al mismo tiempo, algunas personas que habitan la región trabajan en las industrias establecidas en la zona, que incluyen una planta petroquímica y numerosas industrias maquiladoras de mezclilla. Las condiciones laborales dentro de algunas de estas industrias constituyen una exposición de riesgo para la salud, sobre todo en la industria textil, ya que los trabajadores no cuentan con un equipo de protección o de ventilación adecuados y se encuentran expuestos a pelusa de algodón y otras fibras, calor y a vapores de numerosos agentes tóxicos, sustancias cloradas, hidróxido de sodio, índigo y anilina (Tabla 11). En el caso de la petroquímica, aún cuando los trabajadores cuentan con un equipo de protección y atención médica, se produce metanol, además de que la planta maneja sustancias químicas tóxicas como el tolueno y el benceno, éste último un carcinógeno reconocido, y los trabajadores se quejan de vapores y toxinas que causan malestares y en ocasiones, intoxicaciones agudas (Morales et al, 2004).

Por otra parte, la agricultura aún se practica en estas poblaciones y los agricultores manejan pesticidas algunos de los cuales se consideran peligrosos como el paraquat y el 2,4-D, siendo ambos clastogénicos y, el primero de ellos, clasificado como carcinógeno. Los trabajadores sólo emplean los pesticidas por temporada, una o dos veces al año y se protegen usando guantes y botas, pero no máscaras; además, simultáneamente están expuestos al sol y a los canales de riego que llevan agua de los ríos Atoyac y Xochiac (Morales et al. 2004; Montero et al. 2006).

Tabla 11. Compuestos químicos tóxicos usados en las industrias de la zona estudiada (Norma Ocupacional)							
Industria	Compuesto Químico	Vía de exposición más probable	Toxicidad	Mutagenicidad	Carcinogenicidad*	Incorporación en comida	¿Regulado por una norma?
Lavanderías	Blanqueadores clorados (1)	Dérmica e inhalación	Corrosivo en piel y mucosa. Exposición crónica causa irritación dérmica y de las vías respiratorias	Aberciones cromosómicas en linfocitos humanos	No clasificable como carcinógeno en humanos (IARC, grupo 3)	No	No
	Hidróxido de sodio (2)	Dérmica e inhalación	En polvos y aerosoles irrita las vías respiratorias. Altas dosis producen inflamación y obstrucción. Exposición crónica causa ulceración de las fosas nasales e irritación en piel.	Ninguna	Sin información (IARC, grupo 3)	No	La regulación de la EPA establece 2 mg/m <sup>3</sup> en el lugar de trabajo con una jornada de 8 horas, 40 h/semana
	Índigo (3)	Dérmica e inhalación	En polvo irrita piel, ojos y membranas mucosas. Varios compuestos químicos pueden producirse por su descomposición; estos compuestos incluyen la anilina y el ácido pícrico.	Mutagénico en bacterias	Sin información (IARC, grupo 3)	No	No
	Anilina (4)	Dérmica e inhalación	Produce metemoglobinemias y anemia hemolítica afectando riñones, corazón e hígado. Induce cuerpos de Heinz.	—	No clasificable como carcinógeno en humanos (IARC, grupo 3)	No	La NOM-010-STPS-1993 ** establece un límite de 2 ppm en el lugar de trabajo con una jornada de 8 h, 40 h/semana

Tabla 11. Químicos tóxicos usados en las industrias de la zona estudiada (Norma Ocupacional) (continuación)							
Industria	Compuesto Químico	Vía de exposición más probable	Toxicidad	Mutagenicidad	Carcinogenicidad*	Incorporación en comida	¿Regulado por una norma?
Planta petroquímica	Benceno (5)	Inhalación	Exposición crónica causa anemia, hemólisis e inmunosupresión.	Aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, mutación en genes, afecta la morfología de los espermatozoides y la fertilidad femenina.	Induce leucemia (IARC, grupo 1)	No	La NOM-010-STPS-1993** establece un límite de 200 ppm en el lugar de trabajo con una jornada de 8 h, 40 h/semana
	Tolueno (6)	Dérmica, inhalación e ingestión	Neurotóxico y nefrotóxico. Altos niveles pueden causar la muerte.	Micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas.	Probablemente no carcinógeno en humanos (IARC, grupo 3)	No	La NOM-010-STPS-1993** establece un límite de 50 ppm en el lugar de trabajo con una jornada de 8 h, 40 h/semana
	Metanol (7)	Dérmica e inhalación	La exposición crónica conduce a dosis internas peligrosas por acumulamiento, y puede causar ceguera y muerte. Su metabolismo produce ácido fórmico y formaldehído, que también son tóxicos.	Teratogénico	(IARC, grupo 4)	No	La NOM-010-STPS-1993** establece un límite de 2 ppm en el lugar de trabajo con una jornada de 8 h, 40 h/semana
Agricultura	Cuproquat y Gramoxona (Paraquat) (8)	Dérmica e inhalación	Inhalado produce daño en los pulmones y envenenamiento. La exposición a preparaciones concentradas a través de la piel puede conducir a un envenenamiento. La exposición continua lleva a que los pulmones fallen y a la enfermedad de Parkinson.	Aberraciones cromosómicas, mutación de genes e intercambio de cromátidas hermanas	Cáncer de piel (IARC, grupo 1)	Se pueden contaminar los cultivos	La NOM-010-STPS-1993** establece un límite de 0.1 mg/m <sup>3</sup> en el lugar de trabajo con una jornada de 8 h, 40 h/semana
	2,4-D (9)	Ingestión a través del agua de bebida	La exposición a altos niveles puede afectar el sistema nervioso, los riñones y el hígado.	Aberraciones cromosómicas, mutación en genes e intercambio de cromátidas hermanas	Está en fase de investigación de carcinogenicidad (IARC, grupo 3)	Puede incorporarse al agua de bebida	La EPA regula los niveles en el agua para tomar con un máximo nivel de 70 ppb.

\* IARC, 2007. \*\* Secretaría del Trabajo y Previsión Social.

<sup>1</sup>ToxFAQs, 2002a. <sup>2</sup>ToxFAQs, 2002b. <sup>3</sup>Jongen WM, 1982; United States National Toxicology Program, 1990; Ramug et al. 1992. <sup>4</sup>ToxFAQs, 2006; ATSDR-MMG. Arilime. <sup>5</sup>ToxFAQs, 2005a. <sup>6</sup>ATSDR, 2001. <sup>7</sup>NIOSH Methyl alcohol. <sup>8</sup>NIOSH Paraquat; CDC Chemical emergencies, 2006.

## **Planteamiento del estudio**

La transición de las actividades económicas en el estado de Tlaxcala ha provocado un deterioro ambiental grave en la zona, que ha comenzado a afectar el estado de salud de los habitantes de comunidades aledañas a los ríos Atoyac y Xochiac, los cuales son usados como drenaje de diversos tipos de residuos, sustancias tóxicas y químicas de las industrias y pequeñas lavanderías que se han instalado en la zona en los últimos años.

La contaminación ambiental y los corredores industriales representan un riesgo para la salud de los habitantes, en especial por estar relacionadas con enfermedades degenerativas y cáncer. En monitoreos previos, realizados con habitantes de varias de estas comunidades, se determinaron frecuencias altas de micronúcleos, como marcadores de daño genotóxico en células sanguíneas en comparación con un grupo control de la Ciudad de México. Se encontró también que las frecuencias más altas de daño se presentaron en individuos portadores del polimorfismo nulo en el gen de la enzima glutatión transferasa T1 (*GSTT1\*0*) (Montero y cols, 2006), cuya frecuencia entre estos pobladores fue del 10%. Otros polimorfismos relevantes en la bioactivación de compuestos tóxicos en el organismo pudieran también influir en los niveles de daño genotóxico. Tales polimorfismos están relacionados con las enzimas del sistema CYP450 cuya función es el metabolismo de sustratos endógenos y la biotransformación de compuestos xenobióticos, como los disolventes encontrados en el ambiente de la zona estudiada.

Numerosos estudios han demostrado que la presencia de polimorfismos en enzimas de CYP450, pueden estar relacionados con factores que incrementan los riesgos a la salud humana; ya sea porque su efecto es incrementar la tasa de bioactivación de un compuesto tóxico o por el contrario, hacer más lento el funcionamiento de una enzima que lo inactiva. En una población donde estos polimorfismos se presentan con una frecuencia elevada, se presentará una distribución de posibles respuestas individuales al efecto de los compuestos tóxicos en la que habrá individuos más resistentes a los efectos dañinos de los compuestos, y en el otro extremo, individuos más susceptibles. El conocimiento del posible efecto que tengan dichos polimorfismos en personas altamente expuestas a sustancias tóxicas, como lo son los habitantes de las distintas comunidades establecidas a lo largo del estado de Tlaxcala, se hace fundamental para comenzar a establecer las medidas necesarias para controlar y disminuir el riesgo a su salud.

Con base en esta información, el presente estudio tuvo como objetivo principal el de buscar una posible relación entre la frecuencia de micronúcleos, como marcadores de exposición y de efecto temprano; y la presencia de tres polimorfismos en dos de las enzimas CYP450 más relevantes en la biotransformación de compuestos tóxicos: el polimorfismo *Ile-Val* en *CYP1A1*, *CYP1A1\*2C*, (detectable mediante la enzima de restricción BsrDI) y los polimorfismos dados por las enzimas de restricción RsaI y PstI en la región flanqueante 5' de la isoforma *CYP2E1*.

El estudio de los polimorfismos de ambas enzimas se basa en el hecho de que se ha reportado la presencia de diversos VOCs en descargas y afluentes del Río Atoyac donde destacan principalmente el cloroformo, el cloruro de metileno y el tolueno, además de que la presencia de las industrias y de la petroquímica son por sí mismas una fuente de emisión de PAHs y de VOCs al aire que rodea a las poblaciones cercanas a ellas.

## **Hipótesis**

1. La frecuencia de los polimorfismos de *CYP1A1* y *CYP2E1* se distribuirá de forma similar a las encontradas en otras poblaciones mexicanas.
2. Los individuos que presentan por lo menos un alelo mutante de los polimorfismos de *CYP1A1* y/o *CYP2E1* estudiados tendrán una frecuencia de MN distinta a la que presentan individuos que no portan estos alelos.

## **Objetivo general**

Determinar si las variantes de los polimorfismos estudiados de *CYP1A1* y *CYP2E1* afectan la frecuencia de MN en habitantes del estado de Tlaxcala.

## **Objetivos particulares**

- \* Obtener las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *CYP1A1\*2C* y de *RsaI/PstI* en *CYP2E1* en habitantes del estado de Tlaxcala.
- \* Conocer si esas frecuencias en los habitantes de Tlaxcala son similares a otras frecuencias reportadas en poblaciones mexicanas y del mundo.
- \* Determinar si la variante alélica del polimorfismo *CYP1A1\*2C* influye en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica.
- \* Determinar si las variantes alélicas de los polimorfismos *RsaI* y *PstI* de *CYP2E1* influyen en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica.
- \* Determinar si los polimorfismos combinados de *CYP1A1* y *CYP2E1* influyen en la frecuencia de MN en linfocitos de sangre periférica.



## **Material y Métodos**

### **Características de los donadores**

Los donadores fueron seleccionados de un grupo de personas que respondieron un cuestionario aplicado en nueve comunidades establecidas a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac en el estado de Tlaxcala y distribuidas en 3 regiones (Anexo 1) y que dieron su consentimiento para participar en el estudio. Las características de inclusión fueron: el rango de edad entre los 19 y 80 años, no presentar diabetes, cáncer o infecciones parasitarias y no tener antecedentes de familiares con cáncer. El grupo incluye agricultores, trabajadores ocupacionalmente expuestos a compuestos tóxicos en las industrias, amas de casa y estudiantes. Los donadores están constituidos por un grupo homogéneo de mestizos.

### **Reactivos**

Los oligonucleótidos C53 y OJA10 para *CYP1A1*, los oligonucleótidos CYP2E1rv y CYP2E1FW para *CYP2E1*, la TaqDNA polimerasa recombinante y los dNTPs para las amplificaciones se compraron a la compañía Invitrogen Life Technologies®. Para la digestión del fragmento amplificado de *CYP1A1* se empleó la enzima de restricción *BsrDI* de las empresas BioLabs y Fermentas, mientras que para la digestión del fragmento amplificado de *CYP2E1* se emplearon las enzimas *RsaI* y *PstI* de la compañía Invitrogen.

### **Amortiguador de Reacción MPCRB**

Para la amplificación se preparó un stock del Amortiguador para PCR con una concentración de 2mM de MgCl<sub>2</sub> (MPCRB); para ello, se filtraron 2.5mL de TRIS 1M pH=8.3, una vez hecho esto se disolvieron 12.5mg de BSA (albúmina), 250mg de Ficol y 2.02mg de Rojo Cresol en 2.5mL de H<sub>2</sub>O y en el TRIS filtrado. Una vez disueltos se adicionó 200µL de MgCl<sub>2</sub> 500 mM y se resuspendió agitando en vórtex. El stock se separó en alícuotas de 1mL en tubos limpios y estériles y cada uno se etiquetó como MPCRB.

### **Oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos para la amplificación del fragmento de *CYP1A1* fueron C53 con la secuencia 5' GAA AGG CTG GGT CCA CCC TCT 3' y OJA 10 con la secuencia 5' TCA GAG GCC TAA GGA CCT CCT AAC C 3'; el primero fue tomado de Hirvonen y cols. (1992) y el segundo fue diseñado por el Dr. Rafael Camacho (Araujo, 2004; Montero et al. 2007). Los oligonucleótidos que se emplearon para la amplificación del fragmento *CYP2E1* fueron CYP2E1FW con la secuencia 5' CCA GTC GAG TCT ACA TTG TCA 3' y CYP2E1rv con la secuencia 5' TCC ATT CTG TCT TCT AAC TGG 3' tomados de Hayashi y cols. (1991b).

### **Extracción de DNA**

De cada individuo se emplearon 500 µL de sangre periférica para extraer el DNA utilizando un Kit de BIO-RAD Aqua Pure Genomic DNA; se siguieron las instrucciones del fabricante y se utilizó RNAsa.

## **Amplificación de un fragmento de la región no codificante 5' de *CYP2E1***

Se amplificaron 102 muestras de los donadores para *CYP2E1*. Para cada muestra se preparó una mezcla de la siguiente forma: 14 µL de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas, 3 µL del DNA purificado, 2 µL de dNTPs (1.6mM), 1 µL del oligonucleótido CYP2E1FW(0.2µM), 1 µL del oligonucleótido CYP2E1rv (0.2 µM), 1.5 µL de la enzima Taq Polimerasa Recombinante (2.5U) y 2.5 µL de amortiguador MPCRb (2mM de MgCl<sub>2</sub>) obteniendo un volumen total de 25 µL. La amplificación del fragmento de la región no codificante 5' de *CYP2E1* se llevó a cabo en un Mastercycler® gradient 5331 de Eppendorf Scientific, Inc. El programa de PCR fue de 30 ciclos, iniciando con un primer paso a una temperatura de 94°C por 3 minutos y ciclos de 30 segundos 94°C, 30 segundos 56°C y 30 segundos a 72°C; al finalizar los ciclos se dejó 3 minutos de extensión a 72°C. El producto de la amplificación por PCR es un fragmento de 410pb que correspondiente a una parte de la región flanqueante 5' de *CYP2E1* y que contiene los sitios polimórficos para *Pst*I y *Rsa*I (ver Fig. R-1 de la sección de resultados). Para corroborar la amplificación del producto de PCR del gen se tomaron 5µL del producto y se corrieron en una electroforesis en un gel de agarosa al 1% durante 45 minutos a 85 volts; para visualizar los fragmentos se utilizó tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Cada imagen fue documentada.

## **Determinación de los polimorfismos de *CYP2E1* dados por las enzimas de restricción *Rsa*I y *Pst*I**

Para conocer la presencia de cada polimorfismo se dividió el producto de PCR tomando 10 µL para determinar el polimorfismo dado por la enzima de restricción *Rsa*I y 10 µL para determinar el dado por la enzima de restricción *Pst*I. Para cada caso, a los 10 µL de producto se les adicionó 1.5 µL de amortiguador de reacción REact® (1X del volumen final), 3.4 µL de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas y 0.1 µL de la enzima de restricción correspondiente (1U de *Rsa*I o *Pst*I). Cada tubo se selló con Parafilm y se dejaron de 20 a 24 horas a 37°C en la estufa. El producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 3% durante 45 minutos a 90 volts, el cual se tiñó con bromuro de etidio. La presencia/ausencia del polimorfismo dada por la enzima de restricción *Pst*I se determinó de la siguiente manera: el homocigoto nativo (*Pst*I<sup>-</sup>) presentó una banda de 410pb; el homocigoto mutante (*Pst*I<sup>+</sup>) presentó dos bandas, una de 290pb y una de 120pb, y el heterocigoto (*Pst*I<sup>-</sup>/*Pst*I<sup>+</sup>) presentó tres bandas, una de 410pb, una de 290pb y otra de 120pb (ver Fig. R-2 de la sección de Resultados); mientras que la presencia/ausencia del polimorfismo dada por la enzima de restricción *Rsa*I se determinó de la siguiente forma: el homocigoto nativo (*Rsa*I<sup>+</sup>) presentó dos bandas, una de 360pb y otra de 50pb; el homocigoto mutante (*Rsa*I<sup>-</sup>) presentó una banda de 410pb, y el heterocigoto (*Rsa*I<sup>+</sup>/*Rsa*I<sup>-</sup>) presentó tres bandas, una de 410pb, una de 360pb y una de 50pb (ver Fig. R-3 de la sección de resultados). Los fragmentos se observaron con una lámpara de luz ultravioleta y cada gel fue documentado.

## **Amplificación de un fragmento que contiene el exón 7 de *CYP1A1***

Se amplificaron muestras de 101 donadores para determinar el genotipo de *CYP1A1\*2C* y para ello se preparó la siguiente mezcla: se agregaron 16.5 µL de agua destilada libre de DNAsas y RNAsas, 1 µL del DNA purificado, 1.5 µL de dNTPs (1.2mM), 1 µL del oligonucleótido C53 (0.2 µM), 1 µL del oligonucleótido OJA 10 (0.2µM), 1.5 µL de la enzima Taq Polimerasa Recombinante (2.5U) y 2.5 µL de amortiguador MPCRb obteniendo un volumen total de 25 µL. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el mismo termociclador que se usó para amplificar *CYP2E1*. El programa de PCR consistió en 30 ciclos con una desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos; cada ciclo consistió en 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineación a 60°C y 45

segundos de extensión a 72°C; al finalizar los ciclos se dejó 3 minutos de extensión a 72°C. La amplificación del producto de PCR se comprobó corriendo 5 µL de cada producto en un gel de agarosa al 1.5% durante 45 minutos a 85volts. El producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 3% durante 45 minutos a 90V. El producto de la amplificación es un fragmento de 760pb que incluye parte de los intrones 7 y 8 y el exón 7 donde se encuentra el polimorfismo *CYP1A1\*2C* (ver Fig. R-4 de la sección de resultados) y para visualizar los fragmentos se utilizó tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta documentando cada gel.

### **Determinación del polimorfismo *Ile/Val***

Para determinar la presencia del polimorfismo *Ile/Val* en *CYP1A1* se tomaron 10 µL del producto de PCR y se les adicionó 1.5 µL de amortiguador R<sup>+</sup>, 0.2 µL de la enzima de restricción *Bsr*DI (1U) y 3.3 µL de H<sub>2</sub>O para llevarlo a un volumen final de 15 µL. Cada tubo se selló con Parafilm y se pusieron a digerir a una temperatura de 65°C en un termoblock Multi-Blok Heater No. 2093 de Lab-Line Instruments, Inc. durante 20-24 horas. Una vez digerido el producto, se determinó la presencia del polimorfismo dado por la enzima de restricción *Bsr*DI como a continuación se describe: el homocigoto nativo (*Ile-Ile*) presentó tres bandas, una de 421pb, una de 253pb y otra de 46pb; el homocigoto mutante (*Val-Val*) presentó dos bandas una de 714pb y otra de 46pb, y el heterocigoto (*Ile-Val*) presentó cuatro bandas, una de 714pb, una de 461pb, una de 253pb y la última de 46pb (ver Fig. R-5 de la sección de resultados). Para visualizar los fragmentos se utilizó tinción con bromuro de etidio y una lámpara de luz ultravioleta. Cada imagen fue documentada.

### **Obtención de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos**

\* Las frecuencias genotípicas para cada polimorfismo se calcularon de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$p^2 = \text{no. de homocigotos nativos} / \text{no. total de individuos}$$

$$2pq = \text{no. de heterocigotos} / \text{no. total de individuos}$$

$$q^2 = \text{no. de homocigotos mutantes} / \text{no. total de individuos}$$

\* Las frecuencias alélicas para cada polimorfismo se calcularon con las siguientes fórmulas:

$$p(\mathbf{A}) = [p^2 + \frac{1}{2}(2pq)] / p^2 + 2pq + q^2, \text{ donde } \mathbf{A} \text{ es el alelo nativo}$$

$$q(\mathbf{B}) = [\frac{1}{2}(2pq) + q^2] / p^2 + 2pq + q^2, \text{ donde } \mathbf{B} \text{ es el alelo mutante}$$

\* Para calcular el equilibrio de H-W se empleó la siguiente fórmula:

$\chi^2 = \sum (\mathbf{o} - \mathbf{e})^2 / \mathbf{e}$ , donde **o** son los observados y **e** son los esperados, y el valor obtenido se comparó con tablas de  $\chi^2$ .

### **Análisis de MN**

El análisis de micronúcleos se llevó a cabo previamente y fueron reportados en Montero y cols. (2006); los datos se tomaron para buscar la correlación con los polimorfismos estudiados. La técnica empleada para la identificación de MN se presenta en el Anexo 2.

### **Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de los datos se emplearon los programas Microsoft Excel y Stata 5.

## Resultados

### 1. Determinación de los genotipos para los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I de *CYP2E1*

Una vez que se comprobó que el producto de la amplificación por PCR era un fragmento de 410pb (Fig. R-1), para cada muestra se determinó el genotipo para los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I corroborando que, para el caso del polimorfismo *Pst*I, el homocigoto nativo presentara sólo una banda de 410pb, el homocigoto mutante dos bandas, una de 290pb y otra de 120pb, y el heterocigoto tres bandas, una de 410pb, una de 290pb y otra de 120pb (Fig. R-2). Para el caso del polimorfismo *Rsa*I, se comprobó que el homocigoto nativo presentara dos bandas, una de 360pb y otra de 50pb, que el homocigoto mutante presentara una banda de 410pb y que el heterocigoto mostrara tres bandas, una de 410pb, otra de 360pb y la última de 50pb (Fig. R-3).

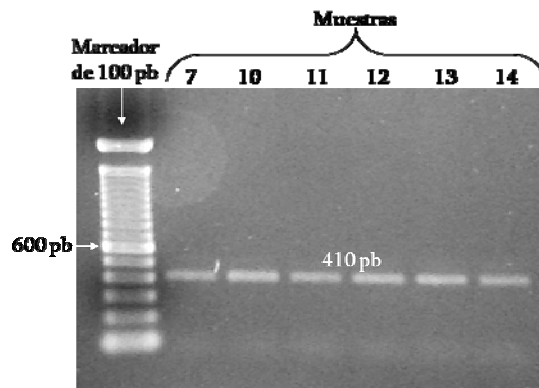


Figura R-1. Amplificación de un fragmento de la región no codificante 5' de *CYP2E1*. El producto de PCR correspondió a un fragmento de 410 pb.

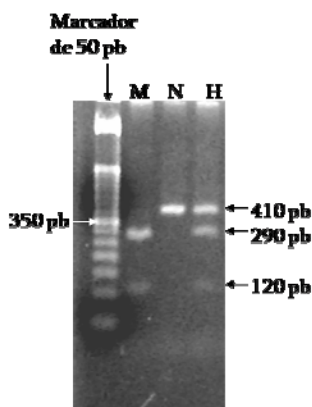


Figura R-2. Digestión del fragmento amplificado de *CYP2E1* con la enzima de restricción *Pst*I. Se obtienen 3 genotipos: N – homocigoto nativo: c1/c1 (línea 2), H – heterocigoto: c1/c2 (línea 3), M – homocigoto mutante: c2/c2 (línea 1).

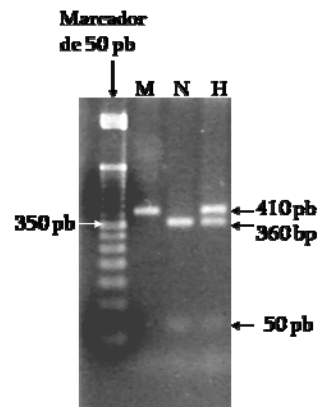


Figura R-3. Digestión del fragmento amplificado de *CYP2E1* con la enzima de restricción *Rsa*I. Se obtienen 3 genotipos: N – homocigoto nativo: c1/c1 (línea 2), H – heterocigoto: c1/c2 (línea 3), M – homocigoto mutante: c2/c2 (línea 1).

## 2. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I de *CYP2E1*

De los 102 genotipos analizados se obtuvo que, para el polimorfismo *Pst*I, 59 son homocigotos nativos (c1/c1), 28 heterocigotos (c1/c2) y 5 homocigotos mutantes (c2/c2) dando una frecuencia genotípica del 57.84%, 37.25% y 4.90% respectivamente (Tabla R-1); mientras que, para el polimorfismo *Rsa*I, se encontró que 41 son homocigotos nativos (c1/c1), 56 heterocigotos (c1/c2) y 5 homocigotos mutantes (c2/c2) obteniendo una frecuencia genotípica del 40.20%, 54.90% y 4.90% respectivamente (Tabla R-2). Las frecuencias alélicas se calcularon a partir de las frecuencias genotípicas de cada polimorfismo obteniendo para *Pst*I un valor de c1 = 0.76471 y c2 = 0.23529 y, para *Rsa*I, c1 = 0.67647 y c2 = 0.32353 (Tabla R-3).

**Tabla R-1. Frecuencias genotípicas del polimorfismo *Pst*I de *CYP2E1* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>Pst</i> I	Frec.	Porcent.	Acum.
c1/c1	59	57.84	57.84
c1/c2	38	37.25	95.1
c2/c2	5	4.90	100
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>100.00</b>	

Polimorfismo *Pst*I: c1/c1 – homocigoto nativo; c1/c2 – heterocigoto; c2/c2 – homocigoto mutante.

**Tabla R-2. Frecuencias genotípicas del polimorfismo *Rsa*I de *CYP2E1* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>Rsa</i> I	Frec.	Porcent.	Acum.
c1/c1	41	40.20	40.2
c1/c2	56	54.90	95.1
c2/c2	5	4.90	100
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>100.00</b>	

Polimorfismo *Rsa*I: c1/c1 – homocigoto nativo; c1/c2 – heterocigoto; c2/c2 – homocigoto mutante.

Para conocer si las frecuencias genotípicas de ambos polimorfismos se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg, se aplicó por separado la prueba de ji-cuadrada en donde se obtuvo para el polimorfismo *Pst*I una  $X^2 = 0.1261$  y para el polimorfismo *Rsa*I una  $X^2 = 6.5964$ ; al comparar cada uno de los valores con la  $X^2$  de tablas, cuyo valor es de 3.841 con una  $\alpha = 0.05$  y 1 GL, se observó que sólo el polimorfismo *Pst*I se encuentra en equilibrio al tener una  $X^2$  calculada menor a la de tablas.

**Tabla R-3. Frecuencias alélicas de los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo	Frecuencias alélicas		N
	c1	c2	
<i>Pst</i> I	0.76471	0.23529	102
<i>Rsa</i> I	0.67647	0.32353	102
	<i>Ile</i>	<i>Val</i>	
<i>CYP1A1*2C</i>	0.42574	0.57426	101

Polimorfismo *Pst*I: c1 – alelo nativo; c2 – alelo mutante.

Polimorfismo *Rsa*I: c1 – alelo nativo; c2 – alelo mutante.

Polimorfismo *CYP1A1\*2C*: *Ile* – alelo nativo; *Val* – alelo mutante.

Dado que la presencia del heterocigoto de *Rsa*I fue mayor que la del heterocigoto de *Pst*I, se obtuvieron las frecuencias de ambos genotipos combinados (*Pst*I/*Rsa*I), observando que 18 de ellos presentaron la combinación homocigoto nativo para *Pst*I y heterocigoto para *Rsa*I (Tabla R-4), por

lo que, para conocer si ambos polimorfismos se encontraban ligados, se determinaron los haplotipos y sus frecuencias mediante el método descrito por Hayashi y cols. (1991b) (Tabla R-4) para posteriormente calcular la frecuencia del ligamiento con la siguiente fórmula:  $p(a1;a2) = f(a1:a2)/f(a1)$ , en donde  $p(a1;a2)$  = probabilidad del ligamiento del alelo 1 (a1) con el alelo 2 (a2);  $f(a1:a2)$  = frecuencia de los alelos 1 y 2, y  $f(a1)$  = frecuencia del alelo 1. Para el caso de nuestro estudio, dado que los alelos de ambos polimorfismos llevan el mismo nombre, la nomenclatura se manejará de la siguiente forma: *c1* y *c2* representan al alelo nativo y al alelo mutante, respectivamente, del polimorfismo *PstI*, y *c1* y *c2* representan al alelo nativo y al alelo mutante, respectivamente, del polimorfismo *RsaI*. Así, se obtuvo que  $p(c1;c1) = 1$ ,  $p(c1;c2) = 0$ ,  $p(c2;c1) = 0$ ,  $p(c2;c2) = 1$ ;  $p(c1;c1) = 0.842$ ,  $p(c1;c2) = 0.158$ ,  $p(c2;c1) = 0$  y  $p(c2;c2) = 1$ .

Los valores anteriores demuestran un grado de ligamiento, por lo que se buscó cuantificar el valor del desequilibrio de enlace como se reportó previamente en poblaciones japonesas (Watanabe et al. 1990; Hayashi et al. 1991a). Para ello, se utilizaron las frecuencias de los haplotipos calculadas en la tabla 4 para la fórmula  $\Delta = h - p_1p_2$  (Vogel y Motulsky, 1997) en donde:

$\Delta$  = desviación del equilibrio de enlace

h = frecuencia del haplotipo *c1c1* (el alelo *c1* de *RsaI* en combinación con el alelo *c1* de *PstI*)

$p_1p_2$  = frecuencias de los alelos *c1c1* combinados considerando una libre recombinación

Con lo anterior se encontró que la desviación del equilibrio de enlace de los alelos *c1-c1* fue de 0.1632.

Genotipo	Polimorfismo				Polimorfismo			
	<i>PstI</i>	<i>RsaI</i>	N	Frec.	<i>RsaI</i>	<i>PstI</i>	N	Frec.
<i>c1/c1</i>	<i>c1/c1</i>	<i>c1/c1</i>	41	0.40196	<i>c1/c1</i>	<i>c1/c1</i>	41	0.40196
<i>c1/c1</i>	<i>c1/c2</i>	<i>c1/c2</i>	18	0.17647	<i>c1/c1</i>	<i>c1/c2</i>	0	0
<i>c1/c1</i>	<i>c2/c2</i>	<i>c2/c2</i>	0	0	<i>c1/c1</i>	<i>c2/c2</i>	0	0
<i>c1/c2</i>	<i>c1/c1</i>	<i>c1/c1</i>	0	0	<i>c1/c2</i>	<i>c1/c1</i>	18	0.17647
<i>c1/c2</i>	<i>c1/c2</i>	<i>c1/c2</i>	38	0.37255	<i>c1/c2</i>	<i>c1/c2</i>	38	0.37255
<i>c1/c2</i>	<i>c2/c2</i>	<i>c2/c2</i>	0	0	<i>c1/c2</i>	<i>c2/c2</i>	0	0
<i>c2/c2</i>	<i>c1/c1</i>	<i>c1/c1</i>	0	0	<i>c2/c2</i>	<i>c1/c1</i>	0	0
<i>c2/c2</i>	<i>c1/c2</i>	<i>c1/c2</i>	0	0	<i>c2/c2</i>	<i>c1/c2</i>	0	0
<i>c2/c2</i>	<i>c2/c2</i>	<i>c2/c2</i>	5	0.04902	<i>c2/c2</i>	<i>c2/c2</i>	5	0.04902
	<i>PstI - RsaI</i>			Frec. estimada	<i>RsaI - PstI</i>			Frec. estimada
Haplotipo	<i>c1 - c1</i>			0.64	<i>c1 - c1</i>			0.68
	<i>c1 - c2</i>			0.12	<i>c1 - c2</i>			0
	<i>c2 - c1</i>			0	<i>c2 - c1</i>			0
	<i>c2 - c2</i>			0.24	<i>c2 - c2</i>			0.32

Polimorfismo *PstI*: *c1/c1* - homocigoto nativo; *c1/c2* - heterocigoto; *c2/c2* - homocigoto mutante.  
 Polimorfismo *RsaI*: *c1/c1* - homocigoto nativo; *c1/c2* - heterocigoto; *c2/c2* - homocigoto mutante.

Aunado a esto, se decidió organizar los genotipos de ambos polimorfismos en dos grupos para el análisis estadístico con MN, dado que se observó una baja frecuencia de homocigotos mutantes, se agruparon en un primer bloque a individuos que no portaban ninguno de los alelos mutantes (homocigotos nativos) y en el segundo grupo se ubicaron a individuos que portan uno, o dos alelos mutantes (heterocigotos y homocigotos mutantes). Las nuevas frecuencias obtenidas se muestran

en la tabla R-5 para el polimorfismo *Pst*I y en la tabla R-6 para el polimorfismo *Rsa*I. Por otra parte, dado que la presencia de *Rsa*I fue mayor, se obtuvo la frecuencia de *Pst*I y *Rsa*I combinados tanto por genotipos (Tabla R-7) como por la presencia/ausencia de los alelos mutantes (Tabla R-8).

**Tabla R-5. Frecuencias de los portadores del alelo mutante *Pst*I de *CYP2E1* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>Pst</i> I	Frec.	Porcent.	Acum.
Nat	59	57.84	57.84
Het/Mut	43	42.16	100
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>100</b>	

Nat – no porta la mutación; Het/Mut – porta uno o dos alelos mutantes.

**Tabla R-6. Frecuencias de los portadores del alelo mutante *Rsa*I de *CYP2E1* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>Rsa</i> I	Frec.	Porcent.	Acum.
Nat	41	40.2	40.2
Het/Mut	61	59.8	100
<b>Total</b>	<b>102</b>	<b>100</b>	

Nat – no porta la mutación; Het/Mut – porta uno o dos alelos mutantes.

**Tabla R-7. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I combinados de *CYP2E1* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>Pst</i> I	Polimorfismo <i>Rsa</i> I			Total
	c1/c1	c1/c2	c2/c2	
<i>c1/c1</i>	41(40.20%)	18 (17.65%)	0 (0.00%)	59 (57.85%)
<i>c1/c2</i>	0 (0.00%)	38 (37.25%)	0 (0.00%)	38 (37.25%)
<i>c2/c2</i>	0 (0.00%)	0 (0.00%)	5 (4.90%)	5 (4.9%)
<b>Total</b>	<b>41(40.20%)</b>	<b>56 (54.90%)</b>	<b>5 (4.90%)</b>	<b>102 (100%)</b>

Polimorfismo *Pst*I: *c1/c1* – homocigoto nativo; *c1/c2* – heterocigoto; *c2/c2* – homocigoto mutante.  
Polimorfismo *Rsa*I: *c1/c1* – homocigoto nativo; *c1/c2* – heterocigoto; *c2/c2* – homocigoto mutante.

**Tabla R-8. Frecuencias de los portadores de alelos mutantes *Pst*I – *Rsa*I combinados de *CYP2E1* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>Pst</i> I	Polimorfismo <i>Rsa</i> I		Total
	Nat	Het/Mut	
Nat	41 (40.2%)	18 (17.65%)	59 (57.85%)
Het/Mut	0 (0.00%)	43 (42.16%)	43 (42.16%)
<b>Total</b>	<b>41(40.2%)</b>	<b>61 (59.81%)</b>	<b>102 (100%)</b>

Nat – no porta la mutación; Het/Mut – porta uno o dos alelos mutantes.

### 3. Determinación de los genotipos para el polimorfismo *CYP1A1\*2C*

Cuando se comprobó que el producto de la amplificación era un fragmento de 760 pb (Fig. R-4), se determinó el genotipo de cada muestra del polimorfismo *CYP1A1\*2C* corroborando que el homocigoto nativo presentara tres bandas, una de 421pb, una de 235pb y la última de 46pb; que el homocigoto mutante presentara sólo dos bandas, una de 714pb y otra de 46pb y que el heterocigoto presentara cuatro bandas, una de 714pb, una de 461pb, una de 253pb y otra de 46pb (Fig. R-5).

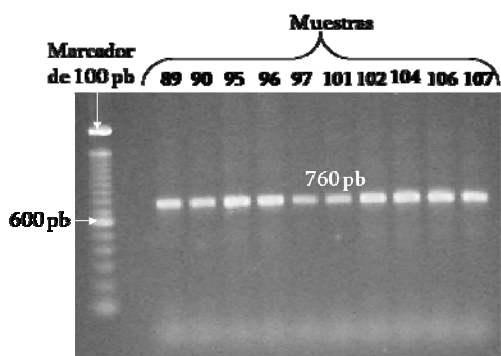


Figura R-4. Amplificación de un fragmento de *CYP1A1* que incluye una parte de los intrones 7 y 8 y el exón 7. El producto de PCR correspondió a un fragmento de 760 pb.

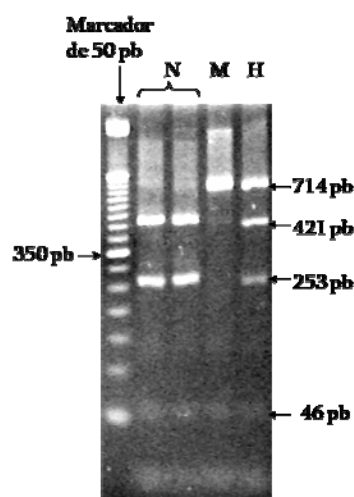


Figura R-5. Digestión del fragmento de *CYP1A1* con la enzima de restricción *BspDI*. Se obtienen 3 genotipos: N - homocigoto nativo: *Ile/Ile* (líneas 1 y 2), H - heterocigoto: *Ile/Val* (línea 4), M - homocigoto mutante: *Val/Val* (línea 3).

#### 4. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *CYP1A1\*2C*

De 101 muestras analizadas se identificaron 13 individuos con el genotipo de homocigotos nativos (*Ile/Ile*), 60 heterocigotos (*Ile/Val*) y 28 homocigotos mutantes (*Val/Val*) y cuyas frecuencias genotípicas obtenidas fueron de 12.87%, 59.41% y 27.72% respectivamente (Tabla R-9). Las frecuencias alélicas obtenidas mediante las frecuencias genotípicas dieron valores de *Ile* = 0.42574 y *Val* = 0.57426 (Tabla R-3).

Se aplicó la prueba de ji-cuadrada para conocer si los genotipos del polimorfismo *CYP1A1\*2C* se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg encontrando una  $X^2 = 4.6659$  que, comparada con la  $X^2$  de tablas, indica que la población no se encuentra en equilibrio para este polimorfismo.

Igual que en el caso de los polimorfismos de *CYP2E1*, para el análisis estadístico se organizaron los genotipos de *CYP1A1\*2C* en dos grupos teniendo en el primero a individuos que no portan el alelo mutante (homocigotos nativos) y en el segundo a aquéllos que portan uno o ambos alelos mutantes (heterocigotos y homocigotos mutantes), las frecuencias obtenidas se presentan en la tabla R-10.

Tabla R-9. Frecuencias genotípicas del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.

<i>CYP1A1*2C</i>	Frec.	Porcent.	Acum.
<i>Ile/Ile</i>	13	12.87	12.87
<i>Ile/Val</i>	60	59.41	72.28
<i>Val/Val</i>	28	27.72	100
Total	101	100.00	

Polimorfismo *CYP1A1\*2C*: *Ile/Ile* - homocigoto nativo; *Ile/Val* - heterocigoto; *Val/Val* - homocigoto mutante.

Tabla R-10. Frecuencias de los portadores del alelo mutante *CYP1A1\*2C* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.

Polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i>	Frec.	Porcent.	Acum.
Nat	13	12.87	12.87
Het/Mut	88	87.13	100
Total	101	100	

Nat - no porta la mutación; Het/Mut - porta uno o dos alelos mutantes.



## 5. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C* combinados.

Para conocer si existe alguna influencia de los polimorfismos combinados de *CYP2E1* y *CYP1A1* sobre la frecuencia de MN, se calcularon las frecuencias genotípicas combinadas de ambos polimorfismos, *RsaI* y *CYP1A1\*2C*. Esta decisión se tomó debido a que de los dos polimorfismos de *CYP2E1* que se estudiaron, *RsaI* ha sido relacionado con cambios en la actividad transcripcional del RNA mensajero y/o actividad de la enzima, lo que no sucede con *PstI* (Watanabe et al. 1994; Le Marchand et al. 1999). El cálculo de las frecuencias se obtuvo a partir de un total de 100 individuos y se observó que la combinación heterocigota para *RsaI* y heterocigota para *CYP1A1\*2C* presentó la mayor frecuencia con 31 individuos (31%), seguida por la combinación nativa para *RsaI* y heterocigoto para *CYP1A1\*2C* con 26 individuos (26%); el resto de los datos se muestran en la tabla R-11.

**Tabla R-11. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos combinados *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>RsaI</i>	Polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i>			Total
	<i>Ile/Ile</i>	<i>Ile/Val</i>	<i>Val/Val</i>	
c1/c1	5 (5%)	26 (26%)	9 (9%)	40 (40%)
c1/c2	7 (7%)	31 (31%)	17 (17%)	55 (55%)
c2/c2	1 (1%)	2 (2%)	2 (2%)	5 (5%)
<b>Total</b>	<b>13 (13%)</b>	<b>59 (59%)</b>	<b>28 (28%)</b>	<b>100 (100%)</b>

Polimorfismo *RsaI*: c1/c1 – homocigoto nativo; c1/c2 – heterocigoto; c2/c2 – homocigoto mutante. Polimorfismo *CYP1A1\*2C*: *Ile/Ile* – homocigoto nativo; *Ile/Val* – heterocigoto; *Val/Val* – homocigoto mutante.

Para el análisis estadístico con MN, se agruparon los portadores de uno o ambos alelos mutantes en un solo grupo, al igual que en los casos anteriores, y al final se obtuvieron cuatro combinaciones que se presentan en la tabla R-12.

**Tabla R-12. Frecuencias de los portadores de las mutaciones combinadas *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C* en habitantes del Estado de Tlaxcala, México.**

Polimorfismo <i>RsaI</i>	Polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i>		Total
	Nat	Het/Mut	
Nat	5 (5%)	35 (35%)	40 (40%)
Het/Mut	8 (8%)	52 (52%)	60 (60%)
<b>Total</b>	<b>13 (13%)</b>	<b>87 (87%)</b>	<b>100 (100%)</b>

Nat – no porta la mutación; Het/Mut – porta uno o dos alelos mutantes.

## 6. Correlación entre la frecuencia de MN y los polimorfismos de *CYP2E1* y *CYP1A1*

Se analizó si existe alguna correlación entre el genotipo de *CYP1A1* y/o de *CYP2E1* y la frecuencia de daño en forma de micronúcleos. Para el análisis se utilizaron los datos previamente obtenidos del estudio de MN en linfocitos de sangre periférica: a) frecuencia de células con MN, b) frecuencia de células con más de un MN (>1MN) y c) total de MN (Montero et al. 2006). Se aplicó

una prueba de regresión robusta en la que se comparó cada tipo de daño contra el genotipo presentado para *CYP1A1*, *CYP2E1* y los dos combinados; alternatively se comparó cada categoría de la frecuencia de MN contra la presencia o ausencia del alelo mutante de cada gen.

De todas las combinaciones analizadas para las tres categorías de frecuencias de MN vs. frecuencias polimórficas, sólo la categoría de células >1MN mostró valores significativos en relación con los polimorfismos estudiados, por lo que sólo se presentarán esos datos (ver Anexo 3). Hay que hacer notar que la frecuencia de células que muestran más de un micronúcleo es normalmente baja; en el estudio realizado por Montero y cols, 2006, un grupo de referencia de habitantes de la ciudad de México mostró una frecuencia cero de estas células, mientras que en nuestro grupo de estudio un tercio de los donadores mostraron este tipo de células.

### 6.1 Correlación entre la frecuencia de células >1MN y los polimorfismos *PstI* y *RsaI* de *CYP2E1*

En el análisis de regresión robusta se encontró una correlación significativa entre la presencia de los genotipos c1/c2 y c2/c2 del polimorfismo *RsaI* (Tabla R-13) y una menor frecuencia de daño genotóxico, esto con una  $p < 0.05$ .

**Tabla R-13. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con el polimorfismo *RsaI* de *CYP2E1*.**

Polimorfismo <i>RsaI</i>	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
c1/c1	.25264706	.28011155	34
c1/c2	.1474359	.31522521	39
c2/c2	0	0	3
Total	.18868421	.29838383	76

Polimorfismo *RsaI*: c1/c1 – homocigoto nativo; c1/c2 – heterocigoto; c2/c2 – homocigoto mutante. Prueba: Regresión robusta,  $P < 0.05$ , Coef. = -0.1345679.

Cuando se analizó el polimorfismo *PstI*, aunque se vio la misma tendencia, no se encontró una correlación significativa; no obstante, como se aprecia en las tablas R-13 y R-14, los genotipos c1/c1 de ambos polimorfismos muestran mayor frecuencia de células con más de 1 MN. No es de extrañar que al analizar los polimorfismos combinados, se haya encontrado que los individuos portadores del alelo c1, muestren mayor daño que los homocigotos c2/c2 (Tabla R-15),  $p < 0.05$ .

**Tabla R-14. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en los genotipos de *PstI* de *CYP2E1*.**

Polimorfismo <i>PstI</i>	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
c1/c1	0.22222222	0.26990646	45
c1/c2	0.155	0.34869598	28
c2/c2	0	0	3
Total	0.18868421	0.29838383	76

Polimorfismo *PstI*: c1/c1 – homocigoto nativo; c1/c2 – heterocigoto; c2/c2 – homocigoto mutante. Sin correlación significativa.

**Tabla R-15. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con los polimorfismos *PstI* y *RsaI* combinados de *CYP2E1*.**

Polimorfismos <i>PstI</i> y <i>RsaI</i> Combinados	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
<i>c1/c1</i> ; <i>c1/c1</i>	.25264706	.28011155	34
<i>c1/c1</i> ; <i>c1/c2</i>	.12818182	.22076314	11
<i>c1/c2</i> ; <i>c1/c2</i>	.155	.34869598	28
<i>c2/c2</i> ; <i>c2/c2</i>	0	0	3
Total	.18868421	.29838383	76

Polimorfismo *PstI*: *c1/c1* – homocigoto nativo; *c1/c2* – heterocigoto; *c2/c2* – homocigoto mutante. Polimorfismo *RsaI*: *c1/c1* – homocigoto nativo; *c1/c2* – heterocigoto; *c2/c2* – homocigoto mutante. Prueba: Regresión robusta,  $P < 0.05$ , Coef. =  $-0.0799098$ .

Al agrupar a los portadores del alelo *c2* de cada polimorfismo, en su forma homocigota o heterocigota, se encontró una diferencia significativa en la frecuencia de células con más de 1 MN, siendo mayor en los portadores del alelo nativo en su forma homocigota (Tablas R-16 y R-17).

**Tabla R-16. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con los portadores de la mutación *PstI* de *CYP2E1*.**

Polimorfismo <i>PstI</i>	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
Nat	.27222222	.26990646	45
Het/mut	.14	.33406586	31
Total	.18868421	.29838383	76

Nat – no porta la mutación; het/mut – porta uno o dos alelos mutantes. Prueba: Regresión robusta,  $P < 0.05$ , Coef. =  $-0.1401426$ .

**Tabla R-17. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con los portadores de la mutación *RsaI* de *CYP2E1*.**

Polimorfismo <i>RsaI</i>	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
Nat	.25264706	.28011155	34
Het/Mut	.13690476	.30589722	42
Total	.18868421	.29838383	76

Nat – no porta la mutación; Het/Mut – porta uno o dos alelos mutantes. Prueba: Regresión robusta,  $P < 0.05$ , Coef. =  $-0.1587289$ .

## 6.2 Correlación entre la frecuencia de células >1MN y el polimorfismo *CYP1A1\*2C*

Como se mencionó en el inicio de este punto, de todas las combinaciones analizadas para las tres categorías de frecuencias de MN vs. frecuencias polimórficas, sólo la categoría de células >1MN mostró valores significativos con relación a los polimorfismos estudiados y por ello se presentan sólo esos resultados.

Sin embargo, a diferencia de los polimorfismos de *CYP2E1*, en donde la categoría de células con más de un micronúcleo (células >1MN) presentó valores significativos con la prueba de regresión robusta, no se encontró una correlación significativa entre la frecuencia de células >1MN y el polimorfismo *2C* de *CYP1A1*; como se ve en las tablas R-19 y R-20, la frecuencia de células >1MN es muy similar entre los tres genotipos y entre portadores y no portadores del alelo mutante *CYP1A1\*2C*, respectivamente.

Tabla R-18. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con el polimorfismo *CYP1A1\*2C*

Polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i>	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
<i>Ile/Ile</i>	0.183	0.33731126	10
<i>Ile/Val</i>	0.19727273	0.30586031	44
<i>Val/Val</i>	0.19809524	0.28054623	21
<b>Total</b>	<b>0.1956</b>	<b>0.29915756</b>	<b>75</b>

Polimorfismo *CYP1A1\*2C* *Ile/Ile* – homocigoto nativo; *Ile/Val* – heterocigoto; *Val/Val* – homocigoto mutante. Sin correlación significativa.

Tabla R-19. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con los portadores de la mutación *CYP1A1\*2C*

Polimorfismo <i>CYP1A1*2C</i>	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
Nat	0.183	0.33731126	10
Het/Mut	0.19753846	0.29571962	65
<b>Total</b>	<b>0.1956</b>	<b>0.29915756</b>	<b>75</b>

Nat – no porta la mutación; Het/Mut – porta uno o dos alelos mutantes. Sin correlación significativa.

### 6.3 Correlación entre la frecuencia de células >1MN y los polimorfismos combinados *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C*

A pesar de que no hubo una correlación significativa entre la frecuencia de células >1MN con relación al polimorfismo *CYP1A1\*2C*, al aplicar la prueba de regresión robusta para determinar una posible asociación entre los polimorfismos *RsaI* y *CYP1A1\*2C* y la frecuencia de células >1MN se encontró que los portadores de los genotipos nativos (o ausencia del alelo mutante) para ambas enzimas tuvieron una mayor frecuencia de células >1MN en comparación con las otras combinaciones de los polimorfismos,  $p < 0.05$  (Tablas R-21 y R-22).

Tabla R-20. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con los polimorfismos *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C* combinados.

Polimorfismos <i>RsaI</i> de <i>CYP2E1</i> y <i>CYP1A1*2C</i> combinados	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
<i>c1/c1; Ile/Ile</i>	.4575	.4170032	4
<i>c1/c1; Ile/Val</i>	.20714286	.24749026	21
<i>c1/c1; Val/Val</i>	.30125	.27992027	8
<i>c1/c2; Ile/Ile</i>	0	0	5
<i>c1/c2; Ile/Val</i>	.2	.37696852	20
<i>c1/c2; Val/Val</i>	.13461538	.27204826	13
<i>c2/c2; Ile/Ile</i>	0	0	1
<i>c2/c2; Ile/Val</i>	0	0	2
<i>c2/c2; Val/Val</i>	0	0	0
<b>Total</b>	<b>.19378378</b>	<b>.30078301</b>	<b>74</b>

Polimorfismo *RsaI*: *c1/c1* – homocigoto nativo; *c1/c2* – heterocigoto; *c2/c2* – homocigoto mutante. Polimorfismo *CYP1A1\*2C* *Ile/Ile* – homocigoto nativo; *Ile/Val* – heterocigoto; *Val/Val* – homocigoto mutante. Prueba: Regresión robusta,  $P < 0.05$ , Coef. = -0.0410251.

Tabla R-21. Frecuencia de células con más de un micronúcleo (células >1MN) en relación con los portadores de las mutaciones combinadas *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C*.

Polimorfismos <i>RsaI</i> de <i>CYP2E1</i> y <i>CYP1A1*2C</i> combinados	Células con >1MN		
	Media	Desv. Estándar	Frec.
Nat; Nat	.4575	.4170032	4
Nat; Het/Mut	.23310345	.2552884	29
Het/Mut; Nat	0	0	6
Het/Mut; Het/Mut	.16428571	.32894918	35
<b>Total</b>	<b>.19378378</b>	<b>.30078301</b>	<b>74</b>

Nat – no porta la mutación; Het/Mut – porta uno o dos alelos mutantes. Prueba: Regresión robusta,  $P < 0.05$ , Coef. = -0.0751246.

## Discusión

Para tratar los resultados obtenidos en este trabajo se decidió manejar la información en dos partes principales con base en los objetivos del mismo. La primera de ellas se concentra en las frecuencias obtenidas de los polimorfismos estudiados de *CYP2E1* y *CYP1A1* y su comparación con las frecuencias encontradas en otras poblaciones Mexicanas y del mundo, mientras que la segunda parte se centra en la posible influencia que pudieran tener estos polimorfismos en la frecuencia de micronúcleos en células de sangre periférica en nuestra población de estudio.

## Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I de *CYP2E1* y del polimorfismo *CYP1A1*\*2C en mestizos de Tlaxcala.

### 1. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I de *CYP2E1*

Inicialmente, los polimorfismos *Pst*I y *Rsa*I de *CYP2E1* fueron encontrados por el grupo de Watanabe y cols. (1990) en una población Japonesa reportando una frecuencia alélica de 0.193 para ambos alelos mutantes. Estudios posteriores reportan que en poblaciones asiáticas, la frecuencia de ambos polimorfismos varía de entre 0.15 y 0.24 (Tabla D-1), con excepción de dos poblaciones chinas en donde se reportan valores de frecuencia de 0.075 (Piao et al. 2003) y en otro estudio de 0.30 (Tan et al. 2000). Sin embargo, en comparación con las frecuencias encontradas en asiáticos, se ha reportado que en poblaciones caucásicas la frecuencia de los alelos mutantes es mucho menor, oscilando entre 0.02 y 0.05, con excepción de una población en Bélgica cuya frecuencia reportada es de 0.12 (Haufrond et al. 2002), un valor mayor al promedio en estas poblaciones (Tabla D-2).

**Tabla D-1. Frecuencia del alelo mutante c2 del polimorfismo *Pst*I y/o *Rsa*I de *CYP2E1* en distintas poblaciones asiáticas.**

Fuente	Población	N	Frecuencia alélica de c2
Watanabe et al. 1990	japonesa	202	0.193
Tan et al. 2000	china	150	0.30
Kongruttanachok et al. 2001	tailandesa	231	0.15
Lee et al. 2001a	coreana	218	0.204
Lee et al. 2001b	coreana	64	0.2
Gao et al. 2002	china	93	0.24
Wan et al. 2002	china	150	0.22
Wong et al. 2002	taiwanesa	333	0.24
Piao et al. 2003	china	20	0.075
Wong et al. 2003	taiwanesa	29	0.22
Ishikawa et al. 2004	japonesa	90	0.18
Ishikawa et al. 2006	japonesa	248	0.22

**Tabla D-2. Frecuencia del alelo mutante c2 del polimorfismo *PstI* y/o *RsaI* de *CYP2E1* en distintas poblaciones caucásicas.**

Fuente	Población	N	Frecuencia alélica de c2
Persson et al. 1993	sueca	148	0.05
Sarmanova et al. 2000	checoslovaca	416	0.023
Wong et al. 2000	inglesa	375	0.033
Griese et al. 2001	aborígenes australianos	239	0.02
Omer et al. 2001	turca	153	0.02
Pastorelli et al. 2001	italiana	124	0.036
Carere et al. 2002	italiana	167	0.0308
Haufroid et al. 2002	belga	30	0.12
Silvestri et al. 2003	italiana	95	0.042
Ernstgard et al. 2004	sueca	27	0.04
Verlaan et al. 2004	holandesa	122	0.02
Vidal et al. 2004	española	519	0.038

En el caso de las poblaciones americanas la presencia de ambos polimorfismos varía mucho entre poblaciones por lo que no pueden generalizarse los valores de las frecuencias entre poblaciones de distintos países (Tabla D-3); sin embargo, las frecuencias reportadas para uno o ambos polimorfismos en poblaciones mexicanas presentan valores muy similares entre sí, oscilando entre 0.15 (mexicanos radicados en Estados Unidos) y 0.24 (otomíes) (Wu et al. 2002; Mendoza et al. 2003; Montano et al. 2006).

En este estudio se encontró que la frecuencia del alelo mutante del polimorfismo *PstI* es de 0.235, valor que concuerda con las otras poblaciones mexicanas estudiadas y que son muy similares a las encontradas en poblaciones asiáticas, aunque no se puede decir lo mismo del polimorfismo *RsaI*, ya que la frecuencia del alelo mutante de este polimorfismo en nuestra población de estudio fue de 0.326, siendo una frecuencia más alta que en las otras poblaciones mexicanas e incluso que en las poblaciones asiáticas.

En los estudios donde se ha evaluado la presencia de ambos polimorfismos de *CYP2E1* se ha observado que las frecuencias genotípicas, y por ende las frecuencias alélicas, de *PstI* y *RsaI* son idénticas en japoneses (Watanabe et al. 1990), africanos y mexicanos que viven en Estados Unidos (Wu et al. 1997), coreanos (Lee et al. 2001b), italianos (Silvestri et al. 2003), holandeses (Verlaan et al. 2004) y en habitantes de la Ciudad de México (Mendoza et al. 2003), lo que concuerda con el reporte inicial de que ambos polimorfismos se encuentran estrechamente ligados, es decir, que los loci de los polimorfismos estudiados al estar tan cerca el uno del otro (*PstI* se encuentra en la posición -1259 y *RsaI* en la posición -1019) casi siempre se heredan juntos (Watanabe et al. 1990; Hayashi et al. 1991a), y aún más, sugiere que las dos variantes se originaron en el mismo cromosoma y que hay un desequilibrio de enlace completo. Por este motivo, en algunos estudios se ha optado por analizar sólo uno de los polimorfismos (Persson et al. 1993; Wong et al. 2000).

**Tabla D-3. Frecuencia del alelo mutante c2 del polimorfismo *Pst*I y/o *Rsa*I de *CYP2E1* en distintas poblaciones de América.**

Fuente	Población	N	Frecuencia alélica de c2
Gattas y Solares Viera, 2000	mulatos de Brasil	86	0.116
Nishimoto et al. 2000	japonesa brasileña	133	0.26
	brasileña	191	0.055
Quiñones et al. 2001	chilena	148	0.16
Gaspar et al. 2002	tribu Aché, Paraguay	67	1.00
	tribu Xavante, Brasil	33	0.03
	tribu Guarani, Brasil	51	0.902
	tribu Wai Wai, Brasil	26	0.81
	tribu Zoró, Brasil	28	0.76
	tribu Surui, Brasil	21	0.54
	tribu Gavião, Brasil	31	0.59
	Wu et al. 2002	africana de E.U.	114
	mexicana de E.U.	92	0.15
Mendoza et al. 2003	mexicana (mestizos)	102	0.2
Montano et al. 2006	otomí, México	59	0.24
Heuser et al 2007	Brasileña	55	0.1545
En este estudio	mexicana (mestizos de Tlaxcala)	102	0.235 para <i>Pst</i> I y 0.326 para <i>Rsa</i> I

Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, las frecuencias alélicas reportadas en este estudio para ambos polimorfismos son distintas entre sí, por lo que, siguiendo los métodos de Hayashi y cols. (1991b) y Vogel y Motulsky (1986) se calculó la frecuencia del ligamiento de los alelos ( $p$ ), la cual nos permite saber si los alelos se heredan juntos dada la cercanía entre ellos y en donde nuestros resultados mostraron claramente que hay un 84.2% de ligamiento del alelo nativo de *Pst*I con el alelo nativo de *Rsa*I ( $p(c1;c1) = 0.842$ ) y un 100% de ligamiento del alelo mutante de *Rsa*I con el alelo mutante de *Pst*I ( $p(c2;c2) = 1$ ) (apartado 2 de Resultados, Tabla R-4); por lo que se puede decir que ambos polimorfismos están estrechamente ligados y que la probabilidad de que se hereden juntos es muy alta; sin embargo, manifiestan un cierto grado de recombinación.

Se sabe que aún cuando el ligamiento es bastante cercano, repetidos entrecruzamientos después de muchas generaciones causa la presencia de una distribución azarosa entre los alelos de dos genes, o como en este caso, dos polimorfismos en un mismo gen, generando así un *equilibrio de enlace* en donde las frecuencias de la fase de acoplamiento (nativo/nativo, mutante/mutante) y de repulsión (nativo/mutante; mutante/nativo) se igualan; sin embargo, cuando en la población hay una desviación de este equilibrio, se dice que los alelos se encuentran en *desequilibrio de enlace* (LD), tendencia que presentan alelos particulares en loci separados que son heredados juntos debido a una baja recombinación entre ellos, lo que puede conducir a asociaciones entre alelos en una población (Vogel y Motulsky, 1997; Jobling et al. 2004); lo cual se debe a tres factores principales: 1) la población de estudio se originó de la combinación de los genes de dos poblaciones con diferentes frecuencias de los alelos A, a y B, b, y el tiempo transcurrido desde la combinación de los genes de las poblaciones no es suficiente para que se genere una distribución al azar completa;

2) para dos alelos mutantes que están localizados muy cercanamente, el número de generaciones que han transcurrido desde que se originaron no es suficiente como para separarlos por recombinación y, 3) ciertas combinaciones de alelos en loci de genes ligados se mantienen en una alta frecuencia por selección natural (Vogel y Motulsky, 1997).

Una vez que se confirmó que efectivamente los alelos de *PstI* y *RsaI* se encuentran estrechamente ligados, y dado que anteriormente se reportó que ambos se encontraban en desequilibrio de enlace (Watanabe et al. 1990; Hayashi et al. 1991a), se prosiguió a averiguar si este mismo fenómeno se presentaba en la población analizada, obteniendo la desviación del equilibrio de enlace ( $\Delta$ ); parámetro que se define como la diferencia entre la frecuencia observada del haplotipo de dos loci y la frecuencia esperada (basada en las frecuencias alélicas observadas), por lo que si ambos alelos se segregaran al azar y el valor obtenido es diferente de cero, se indica la presencia de un desequilibrio. En la población de estudio, el valor de  $\Delta$  obtenido fue de 0.1632, lo que indica que hay un desequilibrio entre los dos polimorfismos, lo que probablemente podría deberse a la cercanía que ambos polimorfismos tienen, ya que entre más cerca estén los loci, mayor es el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio y como es bien sabido la distancia entre ambos loci es de tan sólo 240pb.

Por otra parte, la diferencia entre las frecuencias de los alelos mutantes de los polimorfismos estudiados se vio reflejada en las frecuencias genotípicas. Para el polimorfismo *RsaI*, el número de individuos con genotipo heterocigoto fue mayor que el número de individuos con genotipo homocigoto nativo u homocigoto mutante, teniendo una frecuencia del 54.9% y siendo similar a la reportada en el grupo control de una población otomí en México, cuya frecuencia de heterocigotos fue del 52.1% (Montano et al. 2006). Para el polimorfismo *PstI*, el número de individuos con genotipo homocigoto nativo fue mayor que el de los otros dos genotipos, de 57.84%, concordando con los reportes de las frecuencias genotípicas para este polimorfismo en otras poblaciones cuyas frecuencia del homocigoto nativo va de entre 55.3% y 66.6% en asiáticos y de 92.9% en españoles (Hong et al. 2000; Wan et al. 2002; Wong et al. 2002; Wong et al. 2003; Vidal et al. 2004). Sólo se encontró un reporte en donde el número de heterocigotos del polimorfismo *RsaI* era mayor con respecto al del polimorfismo *PstI* en uno de los grupos de estudio y viceversa para otro de los grupos, aunque esta variación se debió sólo a dos individuos, uno por cada grupo en una población italiana (Carere et al. 2002). En el presente estudio, la frecuencia de genotipos entre ambos polimorfismos fue mayor (Tablas R-1 y R-2 de los resultados). En el caso de los portadores del genotipo heterocigoto para ambos polimorfismos o dobles heterocigotos, encontramos que en la población estudiada, la frecuencia fue de 37.25%, valor que es mucho mayor al registrado en algunas poblaciones caucásicas, cuyo valor se encuentra entre el 5% y el 10% (Haufroid et al. 2002; Silvestri et al. 2003; Verlaan et al. 2004); pero que es similar al reportado en una población coreana, cuya frecuencia de dobles heterocigotos fue de 34.4% (Lee et al. 2001b).

## **2. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *CYP1A1\*2C***

Inicialmente, el polimorfismo *CYP1A1\*2C* fue reportado por el grupo de Hayashi y cols. (1991c) para una población japonesa cuya frecuencia alélica fue de 0.802 para el alelo nativo *Ile* y de 0.198 para el alelo *Val*. Estudios posteriores elaborados en distintas poblaciones asiáticas muestran que la frecuencia del alelo mutante es similar teniendo valores entre 0.183 y 0.275 (Tabla D-4) con excepción de una población china en donde la frecuencia del alelo mutante es mayor a las reportadas (Wang et al. 2002).



**Tabla D-4. Frecuencia alélica del alelo mutante del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en distintas poblaciones asiáticas.**

Fuente	Población	N	Frecuencia alélica de <i>Val</i>
Hayashi et al. 1991	japonesa	358	0.198
Sato et al. 2000	japonesa	142	0.204
Lee et al. 2001	coreana	218	0.275
Song et al. 2001	china	404	0.256
Chen et al. 2002	china	106	0.183
Wang et al. 2002	china	101	0.455
Wu et al. 2002	taiwanesa	324	0.251
Han et al. 2004	coreana	661	0.24
Ishikawa et al. 2004	japonesa	90	0.21
Ng et al. 2005	china	161	0.239
Tsai et al. 2006	taiwanesa	393	0.248
Shin et al. 2007	coreana	437	0.268
Tsuchiya et al. 2007	japonesa	178	0.205

Contrario a lo observado en poblaciones asiáticas, en poblaciones caucásicas se reportan frecuencias del alelo mutante de entre 0.027 y 0.075 mostrando que, en caucásicos, el alelo *Val* es mucho más raro que en poblaciones asiáticas; sólo en un caso la frecuencia del alelo mutante fue mayor al resto, una población turca que reporta una frecuencia de 0.131 (Taskiran et al. 2005) la cual sigue siendo menor que las reportadas en poblaciones asiáticas (Tabla D-5).

**Tabla D-5. Frecuencia alélica del alelo mutante del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en distintas poblaciones caucásicas.**

Fuente	Población	N	Frecuencia alélica de <i>Val</i>
Hirvonen et al. 1992	finlandesa	121	0.05
Cascorbi et al. 1996	alemana	880	0.0267
Alexandrie et al. 2000	sueca	54	0.06
Basham et al. 2001	inglesa	1355	0.039
Carere et al. 2002	italiana	169	0.075
Ivaschenko et al. 2002	rusa	90	0.05
Larsen et al. 2005	australiana	581	0.026
Taskiran et al. 2006	turca	202	0.131
Novotna et al. 2007	checa	54	0.037
Sillanpää et al. 2007	finlandesa	479	0.070

A diferencia de los polimorfismos *PstI* y *RsaI* de *CYP2E1*, el polimorfismo *CYP1A1\*2C* ha sido de los más estudiados en poblaciones americanas (Tabla D-6) y dado que Estados Unidos es un país multicultural y multiétnico, las frecuencias reportadas para el alelo *Val* son muy variadas; sin embargo, agrupando algunos valores se puede observar que las poblaciones africanas que radican en Estados Unidos presentan una frecuencia mucho más baja que los mismos caucásicos, oscilando entre la ausencia total del alelo y 0.018; en el caso de poblaciones caucásicas, los valores son

similares a los reportados en caucásicos europeos, variando entre 0.03 y 0.048, y, por otra parte, se encontró en un reporte para una población mexicana radicada en Estados Unidos que la frecuencia fue de 0.246 (Ishibe et al. 1996) y que es similar a las frecuencias reportadas en poblaciones asiáticas.

**Tabla D-6. Frecuencia alélica del alelo mutante del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en distintas poblaciones de Estados Unidos.**

Fuente	Población	N	Frecuencia alélica de <i>Val</i>
Ishibe et al. 1996	africana en E.U.	136	0.018
	mexicana en E.U.	140	0.246
Olshan et al. 2000	estadounidense – raza blanca	165	0.03
	estadounidense–raza negra	24	ausente
Goodman et al. 2001	hawaiana (caucásicos, asiáticos y nativos)	144	0.173
Terry et al. 2003	estadounidense	471	0.039
Slattery et al. 2004	estadounidense (blancos no hispanos, hispanos y africanos de E.U.)	1170	0.047
	estadounidense (blancos no hispanos, hispanos, africanos de E.U., asiáticos y nativos de E.U.)	1010	0.042
Doherty et al. 2005	estadounidense (caucásicas y africanas de E.U.)	420	0.04
Wenzlaff et al. 2005	africana en E.U.	30	0.016
	caucásica en E.U.	148	0.047
Nock et al. 2006	africana en E.U.	177	0.014
	caucásica en E.U.	210	0.026
Cote et al. 2007	africana en E.U.	126	0.011
	caucásica en E.U.	323	0.047
Holt et al. 2007	estadounidense (mujeres blancas)	447	0.0437
	estadounidense (mujeres negras)	126	0.0119
McGrath et al. 2007	estadounidense	975	0.048

Sin embargo, la frecuencia de esta población mexicana en Estados Unidos es menor a las reportadas en distintas poblaciones de América, excepto Estados Unidos (Tabla D-7), cuyas frecuencias van de 0.57 a 1.00 con excepción de dos poblaciones brasileñas en donde no se indica la composición étnica y cuyas frecuencias fueron de 0.13 (Leichsenring et al. 2006) y de 0.301 (Heuser et al. 2007). Las frecuencias más elevadas se encontraron en grupos indígenas con un bajo grado de mestizaje. Estos estudios incluyen a dos poblaciones mexicanas ubicadas en distintas áreas geográficas de México, Coahuila y Tlaxcala-Puebla, en donde se reporta que la presencia del alelo mutante es 0.54 y 0.567 respectivamente (Montero et al. 2007). Probablemente una de las causas por las cuales la diferencia entre las poblaciones mexicanas y la población mexicana en Estados Unidos sea muy marcada se deba al hecho de que la segunda tiene un mayor contacto con otros grupos étnicos y raciales (caucásicos, africanos, asiáticos, americanos, etc.) en comparación con las primeras, ya que el requisito étnico que se solicitaba para formar parte del estudio en las dos poblaciones de Estados Unidos era tener ascendencia mexicana que viviera en Estados Unidos (Ishibe et al. 1996), lo que da pauta a que la frecuencia alélica sea diferente de una generación a otra.

**Tabla D-7. Frecuencia del alelo mutante *Val* del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en distintas poblaciones de América (excepto Estados Unidos).**

<b>Fuente</b>	<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>Frecuencia alélica de <i>Val</i></b>
<b>Quiñones et al. 2001</b>	<b>chilena</b>	<b>120</b>	<b>0.33</b>
<b>Gaspar et al. 2002</b>	<b>tribu Aché, Paraguay</b>	<b>67</b>	<b>1.00</b>
	<b>tribu Xavante, Brasil</b>	<b>33</b>	<b>0.97</b>
	<b>tribu Guarani, Brasil</b>	<b>51</b>	<b>0.902</b>
	<b>tribu Wai Wai, Brasil</b>	<b>26</b>	<b>0.81</b>
	<b>tribu Zoró, Brasil</b>	<b>28</b>	<b>0.76</b>
	<b>tribu Surui, Brasil</b>	<b>21</b>	<b>0.54</b>
	<b>tribu Gavião, Brasil</b>	<b>31</b>	<b>0.59</b>
<b>Paz y Miño et al. 2004</b>	<b>ecuatoriana</b>	<b>66</b>	<b>0.507</b>
	<b>brasileña</b>	<b>--</b>	<b>0.80</b>
	<b>chilena</b>	<b>--</b>	<b>0.77</b>
<b>Leichsenring et al. 2006</b>	<b>brasileña</b>	<b>60</b>	<b>0.13</b>
<b>Heuser et al. 2007</b>	<b>brasileña</b>	<b>53</b>	<b>0.301</b>
<b>Montero et al. 2007</b>	<b>mexicana (Coahuila)</b>	<b>50</b>	<b>0.54</b>
	<b>mexicana (Tlaxcala - Puebla)</b>	<b>149</b>	<b>0.567</b>
<b>En este estudio</b>	<b>mexicana (mestizos de Tlaxcala)</b>	<b>101</b>	<b>0.574</b>

En el presente estudio se encontró que la frecuencia del alelo mutante *Val* es de 0.574, siendo similar a las poblaciones de Coahuila y de la zona de Tlaxcala-Puebla mencionadas anteriormente, asemejándose más aún a esta última, lo que nos permite reforzar este dato puesto que nuestra población de estudio es del mismo estado de Tlaxcala. Por lo anterior, se podría decir que la frecuencia del alelo mutante de *CYP1A1\*2C* en las poblaciones originales americanas era mayor que en las poblaciones caucásicas, africanas y asiáticas.

El equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico en genética de poblaciones que establece que la composición genética de una población permanecerá en equilibrio siempre y cuando: 1) la población sea panmíctica, (todos los individuos tengan la misma probabilidad de aparearse y que ésta sea al azar), 2) que la población sea lo suficientemente grande para disminuir la posibilidad de endogamia, 3) que las frecuencias alélicas y genotípicas se mantengan constantes de generación en generación y 4) que no actúen ninguna de las fuerzas evolutivas como la mutación recurrente, la deriva génica, la selección natural, la endogamia y la migración, para evitar la pérdida o ganancia de alelos (Kalmes y Huret, 2001). Sin embargo, en la población estudiada, estos postulados no se cumplen debido a que desde el cambio de las actividades económicas y el establecimiento de corredores industriales a lo largo de la zona de estudio a principios de los años 90's se observó que muchos nativos de la zona han emigrado hacia los Estados Unidos de Norteamérica mientras que, al mismo tiempo, habitantes de otros estados del país se han establecido en el área como consecuencia de este cambio. Con este constante movimiento poblacional existe la probabilidad de que las frecuencias de los alelos estén fluctuando, por lo que se buscó establecer si los alelos de los tres polimorfismos estudiados se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg, obteniendo que sólo los alelos del polimorfismo *PstI* presentaban esta condición, lo que sugiere que la migración

es un factor que podría estar afectando el equilibrio en por lo menos dos polimorfismos, *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C*.

Ahora bien, para concluir con la primera parte de este trabajo, hay que destacar la importancia de la obtención de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos estudiados por varios motivos. El primero de ellos radica en el hecho de que si bien estos polimorfismos han sido ampliamente estudiados en diferentes poblaciones del mundo, no ha sido así para el caso de nuestro país; los estudios que se han llevado a cabo para la identificación y caracterización de estos polimorfismos en poblaciones mexicanas son muy pocos por lo que la información que de ellos existe es escasa y por lo tanto, su relevancia como posibles factores de susceptibilidad es prácticamente desconocida, segundo motivo por el cual se enfatiza la importancia de su estudio. Ya anteriormente se mencionó que la presencia de estos polimorfismos varía entre las distintas razas y son precisamente las frecuencias alélicas las que nos van a indicar qué parte de la población corre un mayor riesgo; es decir, si uno o más polimorfismos han sido asociados con una menor o mayor susceptibilidad a algún tipo de riesgo a la salud en varias poblaciones, es de importancia saber si dentro de nuestra población de estudio están presentes los alelos variantes, y si es así, con qué frecuencia se está presentando y cuál de los dos alelos estudiados (el nativo o el mutante) es el que va a conferir la susceptibilidad de tal forma que se puedan identificar qué proporción de la población estaría en un mayor riesgo de daño a la salud para que los encargados de la salud pública diseñen las medidas adecuadas para prevenirlo.

## **Correlación entre la frecuencia de células >1MN y los polimorfismos de *CYP2E1* y *CYP1A1***

### **1. Correlación entre la frecuencia de células >1MN con los polimorfismos *PstI* y *RsaI* de *CYP2E1*.**

Debido al cambio en las actividades económicas del estado de Tlaxcala, los habitantes se han visto afectados por las constantes emisiones de una serie de compuestos químicos y tóxicos al ambiente por parte del complejo petroquímico y las fábricas establecidas en la zona. La presencia de altas concentraciones de algunos VOCs (cloruro de metileno, cloroformo, tolueno) en el aire y agua de los ríos Atoyac y Xochiac dentro de la zona de estudio (Morales et al. 2004) y el reporte de una alta frecuencia de daño genotóxico en donadores de las comunidades establecidas a lo largo de estos ríos (Montero et al. 2006) reflejan por sí mismos que los habitantes de esta zona están expuestos a sustancias que han comenzado a dañar su salud, lo que se refleja en altas frecuencias de daño genotóxico. Si a lo anterior le sumamos el hecho de que es bien conocido que *CYP2E1* se caracteriza por metabolizar y activar una gran variedad de VOCs y, que se ha reportado que las variantes alélicas de los polimorfismos *PstI* y *RsaI* pueden alterar su actividad transcripcional (Hayashi et al. 1991b; Mendoza, 2003) o enzimática (Lucas et al. 1996; Le Marchand, 1999), volviéndola un posible factor de susceptibilidad, es posible suponer que *CYP2E1* podría incrementar el daño genotóxico en individuos expuestos a este tipo de compuestos y este efecto, a su vez, se vería alterado por la presencia de los polimorfismos *PstI* y *RsaI* que pudieran estar incrementando o disminuyendo el riesgo a daño genotóxico. Por todo lo anterior, el análisis de la relación entre los polimorfismos *PstI* y *RsaI* y la presencia de daño genotóxico, reflejado a través de la observación de células con más de un MN, nos es de importancia para ayudar a establecer el papel que juegan estos polimorfismos dentro de la generación de un daño por la exposición a agentes tóxicos como son los VOCs.

En el presente estudio, la correlación entre los genotipos del polimorfismo *PstI* y la frecuencia de células >1MN no fue significativa; sin embargo la distribución de las células >1MN tiene una

tendencia a ser mayor en los individuos con genotipo homocigoto nativo (*c1/c1*), que individuos heterocigotos (*c1/c2*) y homocigotos mutantes (*c2/c2*), lo que indica que aquellas personas con genotipo *c1/c1* tienden a tener un mayor daño (tabla 14 en la sección de Resultados). En contraste con lo observado en el presente estudio, Wong y cols. (2003) encontraron en una población de Taiwán que trabajadores expuestos al monómero de cloruro de vinilo que portaban el genotipo *c2/c2* presentaban una mayor frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICH), es decir, presentaban un mayor daño en DNA.

Varios estudios han reportado que la presencia del alelo mutante de *PstI* está relacionada con el incremento de riesgo de daño al DNA, ya sea genotóxico u oxidante. Hong y cols. (2000) encontraron en una población coreana que los individuos expuestos al humo de incendios y que portaban el alelo mutante (*c2*), tenían una mayor concentración del aducto 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OH-dG) en orina, por lo que se sugiere que la presencia del alelo *c2* puede ser un factor importante en el proceso de carcinogénesis. Otro estudio en una población china reportó que fumadores portadores del alelo *c2*, tienen 3.3 veces más riesgo de envenenamiento por benceno que los individuos no fumadores y que no portan el alelo *c2* (Wan et al. 2002). En contraste, algunos estudios no han encontrado asociación alguna entre el riesgo de cáncer o de daño al DNA, y el portar el alelo *c2* del polimorfismo *PstI* y/o *RsaI*. Mientras que Kawamoto y cols. (1995) encontraron que portar la variante alélica del polimorfismo *RsaI* no afecta el metabolismo del tolueno *in vivo* en japoneses, Haufroid y cols. (2002) no observaron ningún efecto de los polimorfismos *PstI* y *RsaI* en el metabolismo de la cloroxazona en belgas. Por su parte, Lee y cols. (2001a) no encontraron asociación del polimorfismo *RsaI* con la concentración del 1-hidroxipireno (1-OHP) o del 2-naftol (2-NAP) en orina de trabajadores en mantenimiento de aviones en Corea.

En el presente estudio, se obtuvo que la presencia del alelo *c1* del polimorfismo *RsaI*, en forma homocigota o heterocigota, confiere mayor susceptibilidad de tener células con más de un micronúcleo que el genotipo homocigoto *c2*. Al analizar los genotipos combinados de *PstI* y *RsaI* se encontró que el genotipo doble homocigoto nativo mostró significativamente mayor frecuencia de células con más de un MN ( $p < 0.05$ ), lo que significa que en aquellos individuos que presentan uno o ambos alelos mutantes de estos polimorfismos, la frecuencia de células  $>1\text{MN}$  tiende a ser menor en comparación con los que no portan los alelos mutantes de *PstI* y/o *RsaI*. Estos datos concuerdan con dos reportes en poblaciones Japonesas saludables en donde se asocia la presencia del genotipo *c1/c1* con un incremento en la frecuencia de MN. En el primero de ellos, Ishikawa y cols. (2004) reportaron inicialmente en una población japonesa saludable que las personas que portan el alelo mutante de *RsaI* tienen una media estadísticamente baja de la frecuencia de MN en comparación con aquéllas que portan el genotipo *c1/c1*. Posteriormente, Ishikawa y cols. (2006) reportaron que los individuos japoneses que portaban el genotipo *c1/c1* del polimorfismo *RsaI* y que además eran bebedores habituales, presentaban un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de MN, encontrando así que la presencia del polimorfismo tiene una clara asociación con los efectos genotóxicos en la población japonesa saludable.

Además, estudios elaborados con otros biomarcadores de genotoxicidad refuerzan la idea de que la presencia del alelo *c2* de *PstI* y/o *RsaI* confiere una protección contra daño en comparación con el alelo nativo de uno o ambos polimorfismos. En un estudio realizado en una población italiana se observó una asociación significativa entre los polimorfismos *PstI* y *RsaI* con la frecuencia de ICH y células con una alta frecuencia de intercambios (CAFI) encontró que la presencia del alelo mutante en individuos no fumadores presentaban una disminución de daño genotóxico reflejado en la frecuencia de ICH (Carere et al. 2002). Un estudio en una población mexicana encontró que individuos con el alelo nativo (*c1*) de *PstI/RsaI* son más susceptibles a los efectos del tolueno ya

que presentaron una mayor cantidad de mRNA, lo que indica que la inducción de *CYP2E1* fue mayor en individuos con este alelo (Mendoza, 2003).

En nuestro estudio se observó que la presencia de los genotipos *c1/c2* y *c2/c2* de *RsaI* tuvieron mayor importancia en el nivel de daño genotóxico que los del polimorfismo *PstI*. Esto tal vez pueda deberse al hecho de que el polimorfismo *RsaI* es el que confiere un cambio en la regulación y expresión del gen de *CYP2E1* y no el polimorfismo *PstI* (Watanabe et al. 1994).

## **2. Correlación entre la frecuencia de células >1MN con el polimorfismo *CYP1A1\*2C*.**

Dado que en los últimos años se han establecido un complejo petroquímico y varias industrias a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac, existe la posibilidad de la emisión al ambiente de una gran variedad de PAHs que son metabolizados y activados por *CYP1A1*. Se ha propuesto que, así como los polimorfismos de *CYP2E1* pueden influir en el daño genotóxico encontrado en donadores de esa zona, el polimorfismo *CYP1A1\*2C* puede jugar también un papel importante en el mismo. Esta idea se ve reforzada debido a que algunos estudios han encontrado que la presencia del alelo *Val* está asociada con un incremento en los niveles de 1-hidroxipireno (1-OHP, metabolito del pireno) en trabajadores de una planta de aluminio en Suecia (Alexandrie et al. 2000); con altos niveles en la concentración de 1-OHP y 2-NAP en coreanos que trabajan en el mantenimiento de aviones (Lee et al. 2001a); con un incremento en la frecuencia de ICH y CAFI en fumadores que fuman <15 cigarros por día en una población italiana (Carere et al. 2002); con un incremento de aductos de benzo[a]pireno diolepóxido (BPDE) en leucocitos de fumadores italianos (Lodovici et al. 2004) y, con una mayor susceptibilidad a inducción de lesiones en DNA por daño oxidante en policías checos (Novotna et al. 2007). Además, se ha reportado en una población japonesa que este mismo alelo está asociado con el incremento en la concentración de ácido hipúrico (HA), un metabolito del tolueno que se mide en la orina en trabajadores que manejan tolueno en una imprenta, en una fábrica de partes eléctricas y en trabajos de pintura (Kawamoto et al. 1995), y precisamente se ha reportado la presencia de tolueno en el río Atoyac (Morales et al. 2004).

Sin embargo, en los resultados del presente estudio se obtuvo que la presencia del polimorfismo *CYP1A1\*2C* no está asociada con un incremento o disminución de daño genotóxico. Esto se puede observar claramente en las tablas R-18 y R-19 de la sección de resultados, en donde la presencia de células >1MN es muy similar entre los diferentes genotipos dados por este polimorfismo; esta misma tendencia se presentó en las otras dos categorías de MN analizadas en este estudio.

Estudios realizados en otras poblaciones reportan datos similares a los encontrados. Ishikawa y cols. (2004) no hallaron una influencia detectable del polimorfismo *CYP1A1\*2C* en la frecuencia de MN, esto en japoneses; Hong, y cols. (2000) no encontraron un efecto del polimorfismo en la concentración de la 8-OH-dG en coreanos; en brasileños expuestos a pesticidas no se encontró ninguna relación del polimorfismo con la presencia de aberraciones cromosómicas (Paz y Miño et al. 2004), y Hoffman y cols. (2005) observaron que el polimorfismo aparentemente no influía en el daño a DNA por el humo de cigarro a través de un ensayo cometa en alemanes.

Como los resultados obtenidos en nuestro trabajo mostraron que la distribución del daño genotóxico es similar en los tres genotipos del polimorfismo *CYP1A1\*2C* se puede suponer que el alelo *Val* no está influyendo en la presencia de daño genotóxico de los donadores, probablemente porque la presencia de los PAHs no es tan grande como para que se vea reflejado, en comparación con lo reportado en grupos expuestos a PAHs, ya sea por una exposición laboral (Alexandrie et al. 2000; Lee et al. 2001; Novotna et al. 2007) o por su estilo de vida (Carere et al. 2002; Lodovici et al. 2004).

### 3. Correlación entre la frecuencia de células >1MN con los polimorfismos *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C* combinados.

Para ver la posible influencia de los genotipos combinados de *CYP2E1* y *CYP1A1* estudiados en este trabajo en la presencia de daño genotóxico, se decidió utilizar sólo el polimorfismo *RsaI* de *CYP2E1* ya que, como se mencionó anteriormente, se ha reportado que este polimorfismo se encuentra asociado con un cambio en la actividad de CYP2E1 y no así el polimorfismo *PstI*; en cuanto al efecto de la mutación, sin embargo, hay controversia, pues mientras Watanabe y cols. (1994) reportaron un incremento en la actividad transcripcional debida al alelo c2, otros estudios reportaron que la presencia del alelo c2 de *RsaI* puede estar asociado con la disminución en la actividad enzimática o no inducibilidad (Lucas et al. 1995; Carriere et al. 1996; Kim et al. 1995; Kim et al. 1996) o bien, se ha asociado con una disminución en la actividad enzimática *in vitro* (Lucas et al. 1996) e *in vivo* (Le Marchand et al. 1999) de CYP2E1 y una menor presencia de mRNA en portadores del alelo c2 (Mendoza, 2003). Dado que CYP2E1 es la enzima que activa una gran variedad de VOCs, entre ellos el benceno, con actividad genotóxica y/o carcinogénica, el hecho de tener una actividad disminuida de esta enzima obligaría a que el metabolismo de estos compuestos tomara una ruta diferente de la ruta de activación usual, reduciéndose así los efectos tóxicos. Pero si bien existen estas discrepancias, lo cierto es que se ha observado que el polimorfismo *RsaI* puede influir en el riesgo a la salud, algo que se ve reforzado por nuestros propios resultados, en donde observamos que efectivamente el alelo c2 influye en una menor presencia de daño genotóxico.

Ya que hasta el momento este estudio es el primero que ha determinado la asociación entre el posible efecto de los polimorfismos *RsaI* de *CYP2E1* y *CYP1A1\*2C* combinados, nuestros resultados no pueden compararse con otros estudios. Al aplicar la prueba estadística se obtuvo una correlación significativa en donde los individuos que portan ambos alelos nativos (c1 e *Ile*) presentaron un mayor daño genotóxico. Sin embargo, también es cierto que los individuos que presentaron la mayor frecuencia de células >1MN fueron aquéllos con genotipo c1/c1 sin importar el genotipo de *CYP1A1\*2C* (ver Tablas R-20 y R-21 de los resultados), por lo que las personas que portan por lo menos un alelo mutante del polimorfismo *RsaI* están más protegidas contra un daño genotóxico que aquéllas que no lo portan.

Si bien no se ha caracterizado la presencia de VOCs en el aire de la zona de estudio, la identificación de varios VOCs en los ríos Atoyac y Xochiac, su volatilidad a temperatura ambiente, así como la exposición laboral de los trabajadores, y el conocimiento de que la presencia de altas concentraciones de VOCs en el aire de zonas cercanas a tiraderos industriales y de plantas petroquímicas puede generar el desarrollo de enfermedades y cáncer como la leucemia infantil (Reynolds et al. 2003; Knox E G, 2008), son información suficiente para sugerir que los habitantes de esta zona presentan un mayor riesgo a daño genotóxico el cual puede verse intensificado por la presencia del alelo c1 del polimorfismo *RsaI*, puesto que nuestros resultados sugieren que el portar esta variante confiere susceptibilidad por la exposición a estos compuestos, probablemente porque su activación es mayor que la que se presenta cuando se porta el alelo c2.

## Conclusiones

^^ La frecuencia alélica del alelo mutante del polimorfismo *PstI* de *CYP2E1* es similar a las reportadas en asiáticos, mientras que la frecuencia alélica del alelo mutante del polimorfismo *RsaI* de *CYP2E1* es ligeramente más alta.

^^ Los polimorfismos *PstI* y *RsaI* se encuentran estrechamente ligados y en desequilibrio de enlace.

^^ La frecuencia del alelo *Val* del polimorfismo *CYP1A1\*2C* es mayor que las reportadas en caucásicos, asiáticos y africanos, y concuerda con lo encontrado en poblaciones consideradas nativas de América.

^^ Sólo el polimorfismo *PstI* se encuentra en equilibrio de H-W y no así *RsaI* ni *CYP1A1\*2C*, lo que puede deberse a la migración que se ha dado desde 1990 como una posible consecuencia del establecimiento de los complejos industriales.

^^ Portar los alelos mutantes de *PstI* y/o *RsaI* confirmó una protección contra el daño genotóxico encontrado en la zona en comparación con el alelo nativo.

^^ Portar el alelo mutante del polimorfismo *CYP1A1\*2C* no influyó en la presencia de un mayor o menor daño genotóxico.

^^ Si se asocia la presencia de VOCs en el ambiente de la zona de estudio en Tlaxcala, y si efectivamente el alelo c2 de *RsaI* redujera la actividad de *CYP2E1*, nuestros resultados podrían sugerir que el portar esta variante confiere resistencia a la exposición a estos compuestos, probablemente porque su activación está reducida.



## Anexo 1



Mapa de la zona de estudio. Las líneas gruesas representan el curso de los ríos Atoyac y Xochiac. Las puntas de la flechas indican la dirección del flujo de los ríos. Las estrellas grandes representan las descargas de la planta petroquímica; las estrellas pequeñas representan las descargas de las industrias textiles y la estrella transparente representa la unión de los ríos Atoyac y Xochiac. (Fuente: Montero et al. 2006).

## Anexo 2

### **Técnica para determinar la frecuencia de MN**

#### **Cultivo de Linfocitos**

El manejo de la sangre y los reactivos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar y cada experimento se manejó por duplicado. Se tomaron 0.5 mL de sangre entera de cada donador, heparinizada, y se agregaron a 6.5 mL de una mezcla de medio RPMI-1640, PHA al 2.8% y BrdU 15  $\mu$ M concentración final (Sigma, México). Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo, cada cultivo se resuspendió en vórtex hasta obtener una resuspensión completa del paquete celular y se agregó 1 mL de KCl 0.075 M a temperatura ambiente para nuevamente resuspender en el vórtex. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1300 rpm, durante 7 minutos y una vez concluido esto se extrajo el sobrenadante de todos los cultivos hasta una distancia de 3 mm por encima del paquete celular. Nuevamente se resuspendió cada cultivo y se agregó a cada uno 10 mL de solución fijadora Carnoy (metanol 3: ácido acético 1). Ya con el fijador, cada cultivo se homogenizó en el vórtex y se centrifugó a 1500 rpm por 7 minutos para después retirar el sobrenadante hasta 3 mm por encima del paquete celular. Se agregaron 7 mL de fijador y se resuspendió para nuevamente centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos. El paso anterior se repitió hasta obtener un paquete celular limpio de color blanco; cuando esto ocurrió se agregaron 5 mL de fijador, se resuspendieron y los cultivos se sellaron y refrigeraron durante al menos 24 hrs.

#### **Montaje en laminillas**

Se retiró el sobrenadante hasta una distancia de 5 mm por encima del paquete celular y se agregó 1 mL de fijador nuevo. Se resuspendió cada cultivo con una pipeta Pasteur hasta obtener una suspensión homogénea y, para cada cultivo, se preparó una laminilla con 5 gotas de la suspensión que se dejó secar y posteriormente las laminillas se tiñeron con Giemsa.

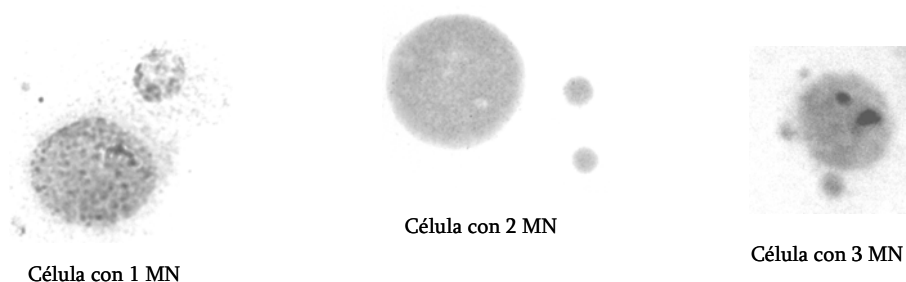
#### **Análisis de MN**

Se evaluaron dos cultivos por donador y se contaron 2000 células por cada cultivo. Para el caso de MN, de cada laminilla se evaluó lo siguiente: a) el número de células con un MN, b) el número de células con más de un MN y c) el número total de células con MN (con uno o más MN). Posteriormente se calcularon las frecuencias del biomarcador con base en la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia } X = (\text{Número de } X \text{ encontrados} / 4000) \times 1000$$

En donde  $X$  es el biomarcador evaluado.

**Figura 1. Presencia de MN en linfocitos de sangre periférica en habitantes de comunidades a lo largo de los ríos Atoyac y Xochiac en Tlaxala, México.**



### Anexo 3

Frecuencia de las tres categorías de MN analizadas con relación a los genotipos de los polimorfismos estudiados												
Biomarcador	Polimorfismo PstI				Polimorfismo RsaI				Polimorfismo CYP1A1*2C			
	Células con 1 MN	c1/c1	c1/c2	c2/c2	Total	c1/c1	c1/c2	c2/c2	Total	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val
Media	1,53	1,94	1,44	1,67	1,48	1,86	1,44	1,67	1,72	1,62	1,64	1,64
Mediana	1,5	2	1,33	1,5	1,17	2	1,33	1,5	1,67	1,5	2	1,5
Error Est.	0,15	0,24	0,58	0,13	0,18	0,19	0,58	0,13	0,39	0,18	0,2	0,13
Frec.	45	28	3	76	34	39	3	76	10	44	21	75
<b>Células con &gt;1MN</b>												
Media	0,22	0,16	0,00	0,19	0,25	0,15	0,00	0,19	0,18	0,20	0,20	0,20
Mediana	0,19	0	0	0	0,11	0	0	0	0	0	0	0
Error Est.	0,04	0,07	0	0,03	0,05	0,05	0	0,03	0,11	0,05	0,06	0,03
Frec.	45	28	3	76	34	39	3	76	10	44	21	75
<b>Total de MN</b>												
Media	1,45	1,77	1,57	1,58	1,55	1,60	1,57	1,58	1,81	1,48	1,59	1,55
Mediana	1,5	1,5	1,33	1,5	1,5	1,5	1,33	1,5	1,67	1,03	1,44	1,5
Error Est.	0,15	0,22	0,51	0,12	0,18	0,17	0,58	0,12	0,3	0,17	0,21	0,12
Frec.	59	38	5	102	41	56	5	102	13	60	28	101

## ***Bibliografía***

- \* ATSDR. 1995a. Acetone CAS #67-64-1. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 1995b. 2-Butanone CAS #78-93-3. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 1997a. Chloroform CAS #67-66-3. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 1997b. Ethylene Glycol CAS# 107-21-1 and Propylene Glycol CAS# 57-55-6. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 1997c. Tetrachloroethylene, PERC, CAS# 127-18-4. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 1999a. Formaldehyde CAS# 50-00-0. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 1999b. N-Hexane CAS #110-54-3. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2001a. Methylene chloride CASS# 75-09-2. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2001b. Toluene. CAS# 108-88-3 Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2002a. Aniline. CAS# 62-53-3 Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2002b. Calcium Hypochlorite CAS# 7778-54-3/Sodium Hypochlorite CAS# 7681-52-9. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2002c. Sodium Hydroxide. CAS# 1310-73-2. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2005a. Benzene. CAS# 71-43-2 Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2005b. Carbon tetrachloride CASS# 56-23-5. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2007a. Benzene. CAS# 71-43-2 Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- 2007b. Ethylene Glycol CASS# 107-21-1. Division of Toxicology and Environmental Medicine ToxFAQs™. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

- \* ATSDR. August, 1995. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- \* ATSDR. February, 2001. Case Studies in Environmental Medicine. Toluene Toxicity. Continuing Education Coordinator, Atlanta.
- \* ATSDR-MMG. November 2005. Medical Management Guidelines. Aniline.  
Website: <http://atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg171.html>.
- \* Albert, Lilia A. 1990. *Curso básico de toxicología ambiental*. Limusa. México. 317p.
- \* Alexandrie, A K, M Warholm, U Carstensen, A Axmon, L Hagmar, J O Levin, C Östman and A Rannug (2000). CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis* **21** (4): 669-676.
- \* Araujo Soto, Antonio Tezozomoc (2004). Comparación de dos Métodos para Determinar Genotipos del Polimorfismo en el exón siete CYP1A1\*2C. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- \* Basham, V M, P D P Pharoah, C S Healey, R N Luben, N E Day, D F Easton, B A J Ponder and A M Dunning (2001). Polymorphisms in *CYP1A1* and smoking: no association with breast cancer risk. *Carcinogenesis* **22** (11): 1797-1800.
- \* Biomarkers Definitions Working Group Bethesda, Md (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **69** (3): 89-95
- \* Bonassi, S, A Znaor, M Ceppi, C Lando, W P Chang, N Holland, M Kirsch-Volders, E Zeiger, S Ban, R Barale, M P Bigatti, C Bolognesi, A Cebulka-Wasilewska, E Fabianova, A Fucic, L Hagmar, G Joksic, A Martelli, L Migliore, E Mirkova, M R Scarfi, A Zijno, H Norppa, M Fenech (2006). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans.
- \* Bukvic, N, M Gentile, F Susca, M Fanelli, G Serio, L Buonadonna, A Capurso, G Guanti (2001). Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutation Research* **498**: 159-167.
- \* CDC Chemical emergencies. May, 2003. Facts About Paraquat.  
Website: <http://www.bt.cdc.gov/agent/paraquat/basics/facts.asp>
- \* Carere, A, C Andreoli, R Galati, P Leopardi, F Marcon, M V Rosati, S Rossi, F Tomei, A Verdina, A Zijno, R Crebelli (2002). Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutation Research* **518**: 215-224.
- \* Carriere, V, F Berthou, S Baird, C Belloe, P Beaune, and I de Waziers (1996). Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics* **6**: 203-211.
- \* Cascorbi I, J Brockmöler, and Ivar Roots (1996). A C4887A Polymorphism in Exon 7 of Human *CYP1A1*: Population Frequency, Mutation Linkages, and Impact on Lung Cancer Susceptibility. *Cancer Research* **56**: 4965-4969.

- \* Catalán, J, G C-M Falck, H Järventaus, T Kallas-Tarpila, L Pitkämäki, and H Norppa (2006). In Vivo Micronuclei in Uncultured T-Lymphocytes of Male Railroad Transit Workers and Referents. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **47**: 345-351.
- \* Chen, S, K Xue, L Xu, G Ma, J Wu (2001). Polymorphisms of the *CYP1A1* and *GSTM1* genes in relation to individual susceptibility to lung carcinoma in Chinese population. *Mutation Research Genomics* **458**: 41-47.
- \* Cote, M L, A S Wenzlaff, C H Bock, S J Land, S K Santer, D R Schwartz, A G Schwartz (2007). Combinations of cytochrome P-450 genotypes and risk of early-onset lung cancer in Caucasians and African Americans: A population-based study. *Lung Cancer* **55**: 255-262.
- \* Derelanko, Michael J y Hollinger, Manfred A. 2002. *Handbook of Toxicology*. 2da. Edición. CRC Press. USA. 1414 p.
- \* Doherty, J A, N S Weiss, R J Freeman, D A Dightman, P J Thornton, J R Houck, L F Voigt, M A Rossing, S M Schwartz, and C Chen (2005). Genetic Factors in Catechol Estrogen Metabolism in Relation to the Risk of Endometrial Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **14** (2): 357-366.
- \* EPA. Organic Gases (Volatile Organic Compounds –VOCs). Environmental Protection Agency. Website: <http://www.epa.gov/iaq/voc.html>
- \* EPA. 1993. *Emission Factor Documentation for AP-42 Section 1.7, Lignite Combustion*. Environmental Protection Agency.
- \* EPA. 2001. *Molds Remediation in Schools and Commercial Buildings*. Environmental Protection Agency.
- \* EPA. 2006. Ground Water & Drinking Water. Consumer Factsheet on 2,4-D. Website: <http://epa.gov/safewater/dwh/c-soc/24-d.html>.
- \* Ernstgard, L, M Warholm & G Johanson (2004). Robustness of chlorzoxazone as an *in vivo* measure of cytochrome P450 2E1 activity. *British Journal of Clinical Pharmacology* **58** (2): 190-200.
- \* Fustinoni, S, D Consonni, L Campo, M Buratti, A Colombi, A C Pesatori, M Bonzini, P A Bertazzi, V Foà, S Garte, P B Farmer, L S Levy, M Pala, F Valerio, V Fontana, A Desideri, and D F Merlo (2005). Monitoring Low Benzene Exposure: Comparative Evaluation of Urinary Biomarkers, Influence of Cigarette Smoking, and Genetic Polymorphisms. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **14** (9): 2237-2244.
- \* Gao, C, T Takezaki, J Wu, Z Li, J Wang, J Ding, Y Liu, X Hu, K Takima, and H Sugimura (2002). Interaction between Cytochrome P-450 2E1 Polymorphisms and Environmental Factors with Risk of Esophageal and Stomach Cancers in Chinese. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **11**: 29-34.
- \* Gaspar, P A, M H Hutz, F M Salzano, K Hill, A M Hurtado, M L Petzl-Erier, L T Tsuneto, and T A Weimer (2002). Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, and TP53 Genes in Amerindians. *American Journal of Physical Anthropology* **119**: 249-256.
- \* Gattas, G.J. y Solares-Vieira, J.A. (2000). Cytochrome P450-2E1 and glutathione S-transferase *mu* polymorphisms among Caucasians and mulattoes from Brazil. *Occupational Medicine (Lond)*. **50**: 508-511.

- \* Goodman, M T, K McDuffie, L N Kolonel, K Terada, T A Donlon, L R Wilkens, C Guo, and L Le Marchand (2001). Case-Control Study of Ovarian Cancer and Polymorphisms in Genes Involved in Catecholestrogen Formation and Metabolism. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **10**: 209-216.
- \* Griese, E. U., K F Llett, N R Kittringham, M Eichelbaum, H Powell, R M Spargo, P N LeSouef, A W Musk, and R F Minchin (2001). Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P4502D6, 2C19 and 2E1 in aborigines from western Australia. *Pharmacogenetics*. **11**: 69-76.
- \* Han, W, D Kang, I A Park, S W Kim, J Y Bae, K W Chung, and D Y Noh (2004). Associations between Breast Cancer Susceptibility Gene Polymorphisms and Clinicopathological Features. *Clinical Cancer Research* **10**: 124-130.
- \* Haufroid, V, J P Buchet, S Gardinal, D Lison (2002). Cytochrome P4502E1 phenotyping by the measurement of the chlorzoxazone metabolic ratio: assessment of its usefulness in workers exposed to styrene. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **75**: 453-458.
- \* Hayashi, S, J Watanabe, K Nakachi, and K Kawajiri (1991a). Genetic Linkage of Lung Cancer-Associated *MspI* Polymorphisms with Amino Acid Replacement in the Heme Binding Region of the Human Cytochrome P450IA1 Gene. *Journal Biochemistry* **110**: 407-411.
- \* Hayashi, S, J Watanabe, and K Kawajiri (1991b). Genetic Polymorphisms in the 5'-Flanking Region Change Transcriptional Regulation of the Human Cytochrome P450IIE1 Gene. *Journal Biochemistry* **110**: 559-565.
- \* Heuser, V D, B Erdtmann, K Kvitko, P Rohr, J da Silva (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology* **232**: 235-247.
- \* Hirvonen, A., K. Husgafvel-Pursiainen, A. Karjalainen, S. Anttila, and H. Vainio (1992). Point-mutational *MspI* and *Ile-Val* Polymorphisms Closely Linked in the *CYP1A1* Gene: Lack of Association with Susceptibility to Lung Cancer in a Finnish Study Population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **1**: 485-489.
- \* Ho KF, Lee SC. (2002). Identification of atmospheric volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carbonyl compounds in Hong Kong. *The Science of the Total Environment*. **289**:145-158.
- \* Hoffmann, H, C Isner, J Högel and G Speit (2005). Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* **20** (5): 359-364.
- \* Holt, S K, M A Rossing, K E Malone, S M Schwartz, N S Weiss, and C Chen (2007). Ovarian Cancer Risk and Polymorphisms Involved in Estrogen Catabolism. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **16** (3): 481-489.
- \* Hong, Y C, H S Park, and E H Ha (2000). Influence of genetic susceptibility on the urinary excretion of 8-hydroxydeoxyguanosine of firefighters. *Occupational and Environmental Medicine* **57**: 370-375.

- \* IARC. 1997. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 63. Dry Cleaning, Some Chlorinated Solvents and Other Industrial Chemicals. Summary of Data Reported and Evaluation. International Agency for Research on Cancer.
- 1998. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human Volume 44. Alcohol Drinking. Summary of Data Reported and Evaluation. International Agency for Research Cancer.
- 1999a. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 29. Some industrial Chemicals and Dyestuffs. Summary Data Report and Evaluation. International Agency for Research Cancer.
- 1999b. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 60. Some Industrial Chemicals. Summary of Data Reported and Evaluation. International Agency for Research Cancer.
- 1999c. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 71. Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. Summary of Data Reported and Evaluation. International Agency for Research on Cancer.
- 1999d. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Volume 73. Some Chemicals that Cause Tumours of the Kidney or Urinary Bladder in Rodents and Some Other Substances. Summary of Data Reported and Evaluation. International Agency for Research Cancer.
- 2000. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human. Volume 77. Some Industrial Chemical. Summary of Data Reported and Evaluation. International Agency for Research Cancer.
- \* IARC 2004. Press Release N° 153. IARC Classifies Formaldehyde as Carcinogenic to Humans. International Agency for Research on Cancer.
- \* IARC. 2007. Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. List of all agents, mixtures and exposures evaluated to date. As evaluated in *IARC Monographs* Volumes 1-98. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthall.php>
- \* IRIS, 1987a. *Styrene (100-42-5)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1987b. *Tetrachloroethylene (127-18-4)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1987c. *Ethyl acetate (141-78-6)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1987d. *Ethylene glycol (107-21-1)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1988. *Methanol (67-56-1)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1989. *Trichloroethylene (79-01-6)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1990. *N,N-Dimethylformamide (68-12-2)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.



- 1991a. *Ethylbenzene (100-41-4)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1991b. *Carbon tetrachloride (56-23-5)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1991c. *Chlorobenzene (108-90-7)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1991d. *Formaldehyde (50-00-0)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1991e. *Propylene glycol (57-55-6)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 1995. *Dichloromethane (75-09-2)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 2000. *Benzene(71-43-2)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 2001. *Chloroform (67-66-3)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 2003a. *Xylenes (1330-20-7)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 2003b. *Acetone (67-64-1)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 2003c. *Methyl ethyl ketone (MEK) (78-93-3)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 2005a. *Toluene (108-88-3)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- 2005b. *n-Hexane (110-54-3)*, <http://www.epa.gov/iris>, US Environmental Protection Agency.
- \* IUPAC. R Heinrich-Ramm, M Jakubowski, B Heinzow, J Molin Cristensen, E Olsen (2000). Biological Monitoring for Exposure to Volatile Organic Compounds (VOCs). *Pure Appl. Chem.*, **72**(3) 385-436.
- \* Ishibe, N, J K Wiencke, Z Zuo, A McMillan, M Spitz, and K T Kelsey (1997). Susceptibility to Lung Cancer in Light Smokers Associated with *CYP1A1* Polymorphisms in Mexican- and African-Americans. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **6**: 1075-1080.
- \* Ishikawa, H, H Yamamoto, Y Tian, M Kawano, T Yamauchi, K Yokoyama (2004). Evidence of association of the *CYP2E1* genetic polymorphism with micronuclei frequency in human peripheral blood. *Mutation Research* **546**: 45-53.
- \* Ishikawa, H, Y Miyatsu, K Kurihara, K Yokoyama (2006). Gene-environmental interactions between alcohol-drinking behaviour and ALDH2 and CYP2E1 polymorphisms and their impact on micronuclei frequency in human lymphocytes. *Mutation Research* **594**: 1-9.
- \* Ivaschenko, T E, O G Sideleva, V S Baranov (2002). Glutathione-S-transferase  $\mu$  and theta gene polymorphisms as new risk factors of atopic bronchial asthma. *Journal of Molecular Medicine* **80**: 39-43.
- \* Jobling, M A, M E Hurles, C Tyler-Smith. 2004. *Human Evolutionary Genetics. Origins, Peoples & Disease*. G S Garland Science Tailor & Francis Group, India, 523 pp.

- \* Jongen, WM (1982). Metabolic activation of promutagenic factors in synthetic indigo by mammalian microsomes. *Carcinogenesis* **3** (11): 1321-1323.
- \* Josephy, P. et al. 1997. *Molecular Toxicology*. Oxford University Press. E.U.A. 368 pp.
- \* Kalmes R, Huret, J L. February 2001. Modelo de Hardy-Weinberg. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Educ/HardySp.html>
- \* Kawamoto, T, M Koga, K Murata, S Matsuda, and Y Kodama (1995). Effects of ALDH2, CYP1A1, and CYP2E1 Genetic Polymorphisms and Smoking and Drinking Habits on Toluene Metabolism in Humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* **133**: 295-304.
- \* Kim, R B, D O'Shea, and G R Wilkinson (1995). Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to CYP2E1 genetic polymorphisms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **57**: 645-655.
- \* Kim, R B, H Yamazaki, K Chiba, D O'Shea, F Mimura, F P Guengerich, T Ishizaki, T Shimada, and G R Wilkinson (1996). *In vivo* and *in vitro* characterization of CYP2E1 activity in Japanese and Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **279**: 4-11.
- \* Kim, J H, J K Kim, B K Son, J E Oh, D H Lim, K H Lee, Y C Hong, and S I Cho (2005). Effects of Air Pollutants on Childhood Asthma. *Yonsei Medical Journal* **46** (2): 239-244.
- \* Klaassen, C. D. and John B. Watkins III. 2003. *Casarett y Doull's Essentials of Toxicology*. McGraw-Hill. USA. 533 pp.
- \* Klaassen, C. D. and John B. Watkins III. 2006. *Casarett y Doull, Fundamentos de Toxicología*. McGraw-Hill Interamericana. México. 536 pp.
- \* Knox, E G (2008). Childhood cancers and atmospheric carcinogens. *Journal of Epidemiology Community Health* **59**: 101-105.
- \* Kongruttanachok, N, S Sukdikul, S Setavarin, V Kerekhjanarong, P Supiyaphun, N Voravud, Y Poovorawan, and A Mutirangura. (2001) Cytochrome P450 2E1 polymorphism and nasopharyngeal carcinoma development in Thailand: a correlative study. *BMC Cancer* **1**: 4-12.
- \* Larsen, J E, M L Colosimo, I A Yang, R Bowman, P V Zimmerman, K M Fong (2005). Risk of non-small cell lung cancer and the cytochrome P4501A1 Ile462Val polymorphism. *Cancer Causes and Control* **16**: 579-585.
- \* Le Marchand, L, G R Wilkinson, and L R Wilkens (1999). Genetic and dietary predictors of CYP2E1 activity: a phenotyping study in Hawaii Japanese using chlorzoxazone. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **8**: 495-500.
- \* Lee, C Y, J Y Lee, J W Kang, H Kim (2001a). Effects of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 on the urinary levels of 1-hydroxypyrene and 2-naphthol in aircraft maintenance workers. *Toxicology Letters* **123**: 115-124.
- \* Lee, H C, H S Lee, S H Jung, S Y Yi, H K Jung, J H Yoon, C Y Kim (2001b). Association Between Polymorphisms of Ethanol-Metabolizing Enzymes and Susceptibility to Alcoholic Cirrhosis in a Korean Male Population. *Journal of Korean Medical Science* **16**: 745-750.
- \* Leichsenring, A, R Losi-Guembarovski, M E Maciel, A Losi-Guembarovski, B W Oliveira, G Ramos, T C S Cavalcanti, M G Bicalho, I J Cavalli, I M S Cólus and E M S F Ribeiro (2006).

*CYP1A1* and *GSTP1* polymorphisms in an oral cancer case-control study. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **39**: 1569-1574.

- \* Lippmann, Morton, et.al. 2003. *Environmental Health Science. Recognition, Evaluation, and Control of Chemical and Physical Health Hazards*. Oxford University Press. USA. 540p.
- \* Lodovici, M, C Luceri, F Guglielmi, C Bacci, V Akpan, M L Fonnesu, V Boddi, and P Dolara (2004). Benzo(a)pyrene Diolepoxide (BPDE)-DNA Adduct Levels in Leukocytes of Smokers in Relation to Polymorphism of *CYP1A1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *GSTT1*, and *mEH*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **13** (8):1342-1348.
- \* Lucas, D, C Menez, C Girre, F Berthou, P Bodenez, I Joannet, E Hispard, L G Bardou, and J F Menez. (1995). Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in health and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* **5**: 298-304.
- \* Lucas, D, J F Menez, and F Berthou (1996). Chlorzoxazone: an *in vitro* and *in vivo* substrate probe for liver CYP2E1. *Methods in Enzymology* **272**: 115-123.
- \* Lucas, D, R Ferrara, E Gonzales, A Albores, M Manno, F Berthou (2001). Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicology Letters* **124**: 71-81.
- \* Ma M, T Umemura, Y Mori, Y Gong, Y Saijo, F Sata, T Kawai, R Kishi (2005). Influence of genetic polymorphisms of styrene-metabolizing enzymes and smoking habits on levels of urinary metabolites alter occupational exposure to styrene. *Toxicology Letters* **160**: 84-91.
- \* Manahan, Stanley E. 2003. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. 3ra. Edición. Lewis Publishers. USA. 424p.
- \* McGrath, M, S E Hankinson, I De Vivo (2007). Cytochrome P450 1A1, cigarette smoking, and risk of endometrial cancer (United States). *Cancer Causes Control* **18**: 1123-1130.
- \* Mendoza Cantú, Ania (2003). Fenotipo y Genotipo del Citocromo 450 2E1 en una Población Ocupacionalmente expuesta a Compuestos Orgánicos Volátiles. Tesis de Doctorado. Sección Externa de Toxicología. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.
- \* Mendoza, A, F Castorena, M Bermudez, R Martínez, A Ortega, J E Salinas and A Albores (2003). Genotype and allele frequencies of polymorphic cytochromes P450 *CYP1A2*<sup>Q1</sup> and *CYP2E1* in Mexicans. *Cell Biochemistry and Function* **21**: 1-6.
- \* Montano, A J, M T Ramirez, I Perez, S Cruz, C Garcia, M E Medina, G Robles, D Kershenobich, G Gutierrez (2006). Association of alcohol-metabolizing genes with alcoholism in a Mexican Indian (Otomi) Population. *Alcohol* **39**: 73-79.
- \* Montero, R., L. Serrano, A. Araujo, V. Dávila, J. Ponce, R. Camacho, E. Morales, and A. Méndez (2006). Increased cytogenetic damage in a zone in transition from agricultural to industrial use: comprehensive analysis of the micronucleus test in peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. **21** (5): 335-342.
- \* Montero, R., A. Araujo, P. Carranza, V Mejía-Loza, L. Serrano, A. Albores, J. E. Salinas, and R. Camacho-Carranza (2007). Genotype Frequencies of Polymorphic *GSTM1*, *GSTT1*, and Cytochrome P450 *CYP1A1* in Mexicans. *Human Biology* **79** (3): 299-312.

- \* Morales Sierra, Eduardo (coordinador), et al. 2004. *Ambiente y Derechos Humanos*. D. R. Centro Fray Julián Garcés, Derechos Humanos y Desarrollo Local, A.C. México. 81 pp.
- \* Moreno, Dolores Ma. 2003. *Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. McGraw-Hill. España. 370 pp.
- \* NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards (a), NIOSH Publication No. 2005-151: Methyl alcohol. Website <http://www.cdc.gov/niosh/npgd397.html>
- \* NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards (b), NIOSH Publication No. 2005-151: Paraquat. Website <http://www.cdc.gov/niosh/npgd0478.html>
- \* NOM-010-STPS-1993. Secretaría del Trabajo y Previsión Social. Subsecretaría de Previsión Social: Dirección General de Seguridad y Salud en el Trabajo. Website: <http://www.stps.gob.mx/> Marco Jurídico.
- \* Ng, D P K, K W Tan, B Zhao & A Seow (2005). *CYP1A1* polymorphisms and risk of lung cancer in non-smoking Chinese women: influence of environmental tobacco smoke exposure and *GSTM1/T1* genetic variation. *Cancer Causes and Control* **16**: 399-405.
- \* Nishimoto, I N, T Hanaoka, H Sugimura, K Nagura, M Ihara, X J Li, T Arai G S Hamada, L P Kowalski, and S Tsugane (2000). Cytochrome P450 2E1 Polymorphism in Gastric Cancer in Brazil: Case-Control Studies of Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **9**: 675-680.
- \* Nock, N L, D Tang, A Rundle, C Neslund-Dudas, A T Savera, C H Bock, K G Monaghan, A Koprowski, N Mitrache, J J Yang, and B A Rybicki (2007). Associations between Smoking, Polymorphisms in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Metabolism and Conjugation Genes and PAH-DNA Adducts in Prostate Tumors Differ by Race. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **16** (6): 1236-1245.
- \* Nomiyama, T, V Haufroid, J P Buchet, H Miyauchi, S Tanaka, T Yamauchi, S Imamiya, Y Seki, K Omae, D Lison (2001). Insertion polymorphism of CYP2E1 and urinary *N*-methylformamide after *N,N*-dimethylformamide exposure in Japanese workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **74**:519-522.
- \* Novotna, B, J Topinka, I Solansky, I Chvatalova, Z Lnenickova, R J Sram (2007). Impact of air pollution and genotype variability on DNA damage in Prague policemen. *Toxicology Letters* **172**: 37-47.
- \* Olshan, A F, M C Weissler, M A Watson, and D A Bell (2000). *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *CYP1A1*, and *NAT1* Polymorphisms, Tobacco Use, and the Risk of Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **9**: 185-191.
- \* Omer, B, U Ozbek, A Akkose, and G Kilic. (2001). Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 in the Turkish population. *Cell Biochemistry and Function* **19**: 273-275.
- \* Ortiz de Montellano, P, et.al. 1997. *Molecular Toxicology*. Oxford University Press. USA. 368p.
- \* Pastorelli, R, G Bardazzi, C Saieva, A Cerri, D Gestri, A Allamani, L Airoidi, and D Palli. (2001). Genetic determinants of alcohol addiction and metabolism: a survey in Italy. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **25**: 221-227.

- \* Paz y Miño, C, M Arévalo, M E Sanchez, P E Leone (2004). Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for *CYP 1A1* gene in Ecuador. *Mutation Research* **562**: 77-89.
- \* Persson, I, I Johansson, H Bergling, M L Dahl, J Seidegard, R Rylander, A Rannug, J Högber and M I Sundberg (1993). Genetic polymorphism of cytochrome P450E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS LETTERS* **319** (3): 207-211.
- \* Piao, Y F, J T Li, Y S (2003). Relationship between genetic polymorphism of cytochrome P450IIE1 and fatty liver. *World J. Gastroenterology* **9** (11): 2612-1214.
- \* Qu, Q, R Shore, G Li, K Su, X Jin, A A Melikian, N Roy, L C Chen, I Wirgin, B Cohen, S Yin, Y Li, R Mu (2005). Biomarkers of benzene: Urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chemico-Biological Interactions* **153-154**: 85-95.
- \* Quiñones, L, D Lucas, J Godoy, D Cáceres, F Berthou, N Varela, K Lee, C Acevedo, L Martinez, A M Aguilera, L Gil (2001). *CYP1A1*, *CYP2E1* and *GSTM1* genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people. *Cancer Letters* **174**: 35-44.
- \* Quiñones. L, K Lee, N Varela, M Escala, K García, L Godoy, A Castro, J Soto, I Saavedra, D Caceres (2006). Farmacogenética del cáncer: Estudio de variaciones genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Revista Médica de Chile* **134**: 499-515.
- \* Rannug U, Bramstedt H, Nilsson U (1992). The presence of genotoxic and bioactive components in indigo dyed fabrics-a possible health hazard? *Mutation Research* **282** (3): 219-225.
- \* Reynolds, P, J Von Behren, R B Gunier, D E Goldberg, A Hertz, and D F Smith (2003). Childhood Cancer Incidence Rates and Hazardous Air Pollutants in California: An Exploratory Analysis. *Environmental Health Perspectives* **111** (4); 663-668.
- \* Sarmanova, J, L Tynkova, S Sosuva, I Gut, and P Soucek. (2000). Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics* **10**: 781-788.
- \* Sato, M, T Sato, T Izumo, T Amagasa (2000). Genetically high susceptibility to oral squamous cell carcinoma in terms of combined genotyping of *CYP1A1* and *GSTM1* genes. *Oral Oncology* **36**:267-271.
- \* Shin, A, D Kang, J Y Choi, K M Lee, S K Park, D Y Noh, S H Ahn and Keun Young Yoo (2007). *Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1)* polymorphisms and breast cancer risk in Korean women. *Experimental and Molecular Medicine* **39** (3): 361-366.
- \* Sillanpää, P, L Heikinheimo, V Kataja, M Eskelinen, V M Kosma, M Uusitupa, H Vainio, K Metsola, A Hirvonen (2007). *CYP1A1* and *CYP1B1* genetic polymorphisms, smoking and breast cancer risk in a Finnish Caucasian population. *Breast Cancer Research and Treatment* **104**: 287-297.
- \* Silvestri, L, L Sonzogni, A De Silvestri, C Gritti, L Foti, C Zavaglia, M Leverì, A Cividini, M U Mondelli, E Civardi and E M Silini (2003). CYP Enzyme Polymorphisms and Susceptibility to HCV-Related Chronic Liver Disease and Liver Cancer. *International Journal of Cancer* **104**: 310-317.

- \* Slattery, M L, W Samowitz, K Ma, M Murtaugh, C Sweeney, T R Levin, and S Neuhausen (2004). *CYP1A1*, Cigarette Smoking, and Colon and Rectal Cancer. *American Journal of Epidemiology* **160**: 842-852.
- \* Song, N, W Tan, D Xing and D Lin (2001). CYP 1A1 polymorphism and risk of lung cancer in relation to tobacco smoking: a case-control study in China. *Carcinogenesis* **22** (1): 11-16.
- \* Tan, W, N Song, G Q Wang, Q Liu, H J Tang, F F Kadlubar, and D X Lin (2000). Impact of Genetic Polymorphisms in Cytochrome P450 2E1 and Glutathione S-Transferases M1, T1 and P1 on Susceptibility to Esophageal Cancer among High-Risk Individuals in China. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **9**: 551-556.
- \* Taskiran C, D Aktas, N Yigit-Celik, M Alikasifoglu, K Yuce, E Tunçbilek, A Ayhan (2006). CYP1A1 gene polymorphism as a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. *Gynecologic Oncology* **101**: 503-506.
- \* Teixeira, J P, J Gaspar, S Silva, J Torres, S N Silva, M C Azevedo, P Neves, B Laffon, J Méndez, C Gonçalves, O Mayan, P B Farmer, J Rueff (2004). Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes *CYP2E1*, *EPHX1*, *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1*. *Toxicology* **195**: 231-242.
- \* Terry, K L, K Titus-Ernstoff, E O Garner, A F Vitonis, and D W Cramer (2003). Interaction between *CYP1A1* Polymorphic Variants and Dietary Exposures Influencing Ovarian Cancer Risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **12**: 187-190.
- \* Tsai, P C, W Huang, Y C Lee, S H Chan, Y L Guo (2006). Genetic polymorphisms in CYP1A1 and GSTM1 predispose humans to PCBs/PCDFs-induced skin lesions. *Chemosphere* **63**: 1410-1418.
- \* Tsuchiya, Y, C Kiyohara, T Sato, K Nakamura, A Kimura, M Yamamoto (2007). Polymorphisms of *cytochrome P450 1A1*, *glutathione S-transferase* class mu, and *tumour protein p53* genes and the risk of developing gallbladder cancer in Japanese. *Clinical Biochemistry* **40**: 881-886.
- \* Umeno M, B J Song, C Kozak, H V Gelboin, and F J Gonzalez (1988). The Rat P450IIE1 Gene: Complete Intron and Exon Sequence, Chromosome Mapping, and Correlation of Developmental Expression with Specific 5' Cytosine Demethylation. *The Journal of Biological Chemistry* **263** (10): 4956-4962.
- \* United States National Toxicology Program. Chemical Status Report. NTP Chemtrack System. Research Triangle Park, N.C. November 6, 1990. 482-89-3 Chemical.
- \* Verlaan, M, R H M Te Morsche, H M J Roelofs, R J F Laheij, J B M J Jansen, W H M Peters and J P H Drenth (2004). Genetic Polymorphisms in Alcohol-Metabolizing Enzymes and Chronic Pancreatitis. *Alcohol & Alcoholism* **39** (1): 20-24.
- \* Vidal, F, A Lorenzo, T Auguet, M Olona, M Broch, C Gutiérrez, C Aguilar, P Estupiñà, M Santos, C Richart (2004). Genetic polymorphisms of ADH<sub>2</sub>, ADH<sub>3</sub>, CYP<sub>450</sub>2E1 Dra-I and Pst-I, and ALDH<sub>2</sub> in Spanish men: lack of association with alcoholism and alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology* **41**: 744-750.
- \* Vineis, P. et al (Editores). 1999. *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer*. International Agency for Research on Cancer. IARC Scientific Publications No. 148. France. 510 pp.

- \* Vogel, F. and A. G. Motulsky. 1997. *Human Genetics: Problems and Approaches*. New York: Springer Verlag.
- \* Wan, J, J Shi, L Hui, D Wu, X Jin, N Zhao, W Huang, Z Xia, and G Hu (2002). Association of Genetic Polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 Genes with Benzene Poisoning. *Environmental Health Perspectives* **100** (12): 1213-1218.
- \* Wang, A H, C S Sun, L S Li, J Y Huang, Q S Chen (2002). Relationship of tabacco smoking, CYP1A1, GSTM1 gene polymorphism and esophageal? Cancer in Xi'an. *World Journal of Gastroenterology* **8** (1): 49-53.
- \* Watanabe, J, S Hayashi, K Nakachi, K Imai, Y Suda, T Sekine, and K Kawajiri (1990). PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Research* **18**: 7194.
- \* Watanabe, J, S Hayashi, and K Kawajiri (1994). Different Regulation and Expression of the Human CYP2E1 Gene Due to the RsaI Polymorphism in the 5'-Flanking Region. *Journal of Biochemistry* **116**: 321-326.
- \* Wenzlaff, A S, M L Cote, C H Bock, S J Land, S K Santer, D R Schwartz, and A G Schwartz (2005). *CYP1A1* and *CYP1B1* polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* **26** (12): 2207-2212.
- \* Wong, N A C S, F Rae, K J Simpson, G D Murray, D J Harrison (2000). Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* **53**: 88-93.
- \* Wong, R H, C L Du, J D Wang, C C Chan, J C J Luo, and T J Cheng (2002). *XRCC1* and *CYP2E1* Polymorphisms as Susceptibility Factors of Plasma Mutant p53 Protein and Anti-p53 Antibody Expression in Vinyl Chloride Monomer-exposed Polyvinyl Chloride Workers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **11**: 475-782.
- \* Wong, R H, J D Wang, L L Hsieh, T J Cheng (2003). *XRCC1*, *CYP2E1* and *ALDH2* genetic polymorphisms and sister chromatid exchange frequency alterations amongst vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers. *Archives of Toxicology* **77**: 433-440.
- \* Wu, X, H Shi, H J, B Kemp, W K Hong, G L Delclos and M R Spitz (1997). Associations between cytochrome *P4502E1* genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer. *Carcinogenesis* **18** (5): 967-973.
- \* Wu, M T, J M Lee, D C Wu, C K Ho, Y T Wang, Y C Lee, H K Hsu and E L Kao (2002). Genetic polymorphisms of cytochrome P450IA1 and oesophageal squamous-cell carcinoma in Taiwan. *British Journal of Cancer*. **87**: 529-532.
- \* Yang, C X, K Matsuo, Z M Wang, K Tajima (2005). Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: A meta-analysis of the literature. *World Journal of Gastroenterology* **11** (17): 2531-2538.