

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE LOS  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA P1  
(GSTP1)**

**ALEYDA MARITZA ACOSTA RANGEL**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
UNIDAD DE TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGENETICA  
POPAYAN  
2003**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE IDENTIFICACIÓN DE LOS  
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA P1  
(GSTP1)**

**ALEYDA MARITZA ACOSTA RANGEL**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de  
Bióloga.**

**Director  
Ph.D. HERNÁN SIERRA**

**Asesor  
Mg. SILVIO CARVAJAL V.**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
UNIDAD DE TOXICOLOGIA GENETICA Y CITOGENETICA  
POPAYAN  
2003**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

**DIRECTOR:**

---

**Ph.D. HERNÁN SIERRA**

**JURADO:**

---

**Ph.D.NOHELIA CAJAS**

**JURADO:**

---

**JURADO Mg. EDNA LOURDES OROZCO**

Fecha de Sustentación: Popayán, 25 de Agosto de 2003.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética, a la Profesora Luz Stella, a la Vicerrectoría de Investigaciones y al Departamento de Biología de la Universidad del Cauca por su apoyo logístico y económico para hacer posible esta investigación.

Mil gracias al director de mi trabajo de grado Ph.D. Hernán Sierra y a mi asesor Mg. Silvio Carvajal por su dedicación, acompañamiento y sus importantes aportes en el desarrollo de la investigación.

Agradezco a las profesoras Mg. Edna Lourdes Orozco y Ph.D. Nohelia Cajas por la evaluación de este trabajo en calidad de Jurados.

Al grupo de Investigación en Genética Humana de la Universidad del Cauca y en especial a Leonora Orjuela y Sulma Muñoz por la capacitación en el campo de la Biología Molecular.

A todas las personas que participaron en el proyecto ya que sin ellas no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A todos mis compañeros y especialmente a mis amigas Paola, Yexania, Dora y Yaneth por su constante colaboración y apoyo.

A mis padres, hermanos y demás familiares quienes estuvieron conmigo apoyándome siempre para que pudiera salir adelante con este trabajo de investigación, con mi carrera profesional y como persona.

Les deseo a todos mucha suerte en su vida personal y profesional.

## Resumen

Los genes de la familia de las Glutathion S-transferasas juegan un papel importante en el metabolismo de sustancias genotóxicas incluyendo metabolitos de carcinógenos. La Glutathion S-transferasa P1 (GSTP1) pertenece a esta familia de genes y tiene variantes polimórficas en el codones 105 (I105V) que sustituye Isoleucina por Valina y el codón 114 (A114V) que sustituye Alanina por Valina. En este trabajo se estandarizó la técnica para identificar el polimorfismo genético de GSTP1 en 65 muestras de ADN de personas del Sur-Occidente Colombiano mediante las técnicas de PCR y RFLPs. La *master mix* optimizó la PCR y los RFLPs obteniendo mejores resultados. La frecuencia preliminar de mutación para GSTP1-I105V (I/V + V/V) fue del 60%; dicha frecuencia se asemeja a las de las poblaciones Noruega, Euro-Americana, Afro-Americana, Alemana, Australiana y Portuguesa, y difiere de las poblaciones Taiwanesa, Francesa, Japonesa, Caucásica y Italiana. La frecuencia preliminar de mutación para GSTP1-A114V (A/V+V/V) fue del 43% en la población estudiada. Dicha frecuencia difiere de las de las poblaciones Euro-Americana, Afro-Americana, Francesa, Inglesa, Alemana e Italiana.

## Abstract

The Glutathion S-transferase genes play an important role in the metabolism of genotoxic compounds including metabolites of carcinogens. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gen belongs to this family and has a polymorphic variant at codon 105 (I105V) has been identified the mutant causes a substitution from Isoleucine to Valine. In this research we standarized the tecnique to identify the genetic polymorphism of GSTP1-I105V in 65 DNA from a southwest Colombian population using PCR and RFLPs techniques. Our master mix optimized PCR and RFLPs procedures to obtain the best results. The mutation preliminary frequency to genotype GSTP1-I105V (I/V + V/V) was 60 % . This frequency is similar to the observed in Norway, Euro-American, Afro-American, German, Australian and Portuguese populations, and it is different to the frequency in Taiwanese, French, Japanese, Caucasian and Italian populations. The mutation preliminary frequency to genotype GSTP1-A114V (A/V+V/V) was 43% in population studied. This frequency is different to the observed in Euro-American, Afro-American, French, England, German and Italian populations.

## CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
2 JUSTIFICACIÓN	14
3 IMPACTO	16
4 MARCO TEÓRICO	17
4.1 Epidemiología Molecular	17
4.2 Metabolismo y Biotransformación	20
4.3 Glutathion S-transferasas	22
4.4 Biología Molecular	25
5 OBJETIVOS	34
6 DISEÑO EXPERIMENTAL	35
7 METODOLOGÍA	36
7.1 Preparación de Reactivos	36
7.2 Cuantificación de ADN	37
7.3 Purificación de ADN	38
7.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	38
7.5 Electroforesis para PCR	39
7.6 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs)	40
7.7 Electroforesis para RFLPs	40
7.8 Registro de datos	41
7.9 Análisis Estadístico	42
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
8.1 Cuantificación de ADN	43
8.2 Polimorfismo genético GSTP1	44
CONCLUSIONES	50
RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA	52
BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA	59
ANEXOS	60

## LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Función de los principales biomarcadores usados en Epidemiología molecular.	19
Tabla 2. Genes de susceptibilidad y enfermedades medioambientales.	21
Tabla 3. Información de los <i>primers</i> en los viales de almacenamiento.	36
Tabla 4. Valores calculados para obtener soluciones stock y de trabajo.	37
Tabla 5. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.	39
Tabla 6. Reactivos utilizados en RFLPs.	40
Tabla 7. Lectura en el espectrofotómetro a 260 y 280 nm e índice de pureza de las muestras de ADN.	43
Tabla 8. Frecuencias genotípicas de GSTP1-I105V en la población estudiada.	46
Tabla 9. Frecuencias genotípicas del gen GSTP1-I105V en poblaciones humanas.	47
Tabla 10. Frecuencias genotípicas de GSTP1-A114V en la población estudiada.	47
Tabla 11. Frecuencias genotípicas del gen GSTP1-A114V en poblaciones humanas.	48

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ubicación del gen GSTP1 en el Cromosoma 11q13.	23
Figura 2. Expresión de la enzima GSTP1 en tejido normal humano.	25
Figura 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa.	29
Figura 4. Separación electroforética de una mezcla de fragmentos de ADN de 10 y 20 nucleótidos de longitud.	30
Figura 5. Enzimas de restricción.	32
Figura 6. Enzimas de restricción con sus sitios de reconocimiento.	33
Figura 7. Representación esquemática de la presencia de bandas en el gel de agarosa bajo una lámpara de luz UV.	41
Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa con el polimorfismo genético de GSTP1	45

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Registro de la absorbancia a 260 nm y 280 nm de 10 muestras de ADN utilizadas en el estudio.	60
Anexo 2. Tabla de registro experimental para GSTP1-I105V	61
Anexo 3. Tabla de registro experimental para GSTP1-A114V	62

## INTRODUCCIÓN

El mecanismo de detoxificación celular es de vital importancia en el mantenimiento de la salud, porque protege a la célula contra numerosos agentes tóxicos que se encuentran en el ambiente (Hayes y Strange, 2000).

El polimorfismo en los genes del metabolismo, que participan en la detoxificación celular, ha sido ampliamente estudiado en muchos grupos étnicos para determinar su importancia en el estudio de enfermedades por exposición ambiental (Kato *et al*, 1999). Lo anterior permite identificar individuos y poblaciones más susceptibles a desarrollar problemas de salud por exposición a agentes genotóxicos.

La superfamilia del gen de la Glutathion S-transferasa (GST) representa el mayor grupo de enzimas de detoxificación y actúan en la segunda fase del metabolismo catalizando la conjugación del glutathion con sustratos electrofílicos. La conjugación con el glutathion incrementa la solubilidad de las sustancias tóxicas en el agua y facilita su salida, generalmente en la orina (Boyland y Chasseand, 1969).

La GSTP1 pertenece a esta superfamilia de genes y tiene dos polimorfismos: en el codón 105 una transición A/G cambia Isoleucina por Valina y en el codón 114 una transición cambia Alanina por Valina, ambos polimorfismos reducen la efectividad de la enzima (Board *et al*, 1989). La Glutathion S-transferasa P1 (GSTP1) metaboliza una gran variedad de carcinógenos potenciales, incluyendo químicos derivados del humo del cigarrillo tales como el benzo(a)pireno diol epóxido y acroleína (Hayes y Pulford, 1995).

Para estandarizar la técnica de identificación de los polimorfismos del gen GSTP1 en los codones 105 y 114 se utilizaron técnicas de biología Molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el Polimorfismo de la Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLPs). Estas técnicas mejoraron el desarrollo investigativo por cuanto permiten conocer molecularmente las diferencias genéticas que existen entre individuos y poblaciones; además, se encontraron frecuencias genotípicas preliminares en el Sur Occidente Colombiano que fueron comparadas con otras poblaciones étnicamente diferentes.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La exposición a agentes genotóxicos y la variabilidad genética son factores determinantes en el desarrollo de enfermedades ambientales (Janice, 2002). Los genes del metabolismo cumplen una función muy importante en la biotransformación de compuestos tóxicos exógenos (xenobióticos) y endógenos.

Dentro de la Epidemiología Molecular, hay estudios que van encaminados a comprender las relaciones existentes entre gen y ambiente, se piensa que las personas con genes favorables, tienen menos riesgo de padecer problemas de salud, mientras que los que tienen una condición genética desfavorable y además se encuentran expuestos a agentes genotóxicos tienen un mayor riesgo de padecer a futuro enfermedades como el cáncer.

La Biotransformación de compuestos tóxicos se agrupa en dos fases: en la fase I se presentan reacciones de oxidación, volviendo más hidrófilo al xenobiótico y transformando sus grupos funcionales en sitios en los que se pueden llevar a cabo reacciones de la fase II; esto también se logra adicionando nuevos grupos funcionales como hidroxilo, amino y carboxilo, entre otros (Peña *et al*, 2001).

En la fase II se presentan reacciones de conjugación donde se adiciona un grupo polar a los grupos funcionales del metabolito del xenobiótico; el resultado es el incremento de su solubilidad en el agua para ser finalmente excretado (Peña *et al*, 2001).

Los genes del metabolismo juegan un papel importante en la detoxificación de agentes tóxicos y su polimorfismo, es decir, las diferentes formas en las que se presenta el gen en una población, puede alterar la eficiencia para eliminar dichas sustancias o sus metabolitos del organismo.

La Glutation S-transferasa (GST) es la familia de genes del metabolismo que más interviene en la detoxificación de xenobióticos y su polimorfismo genético ha sido ampliamente estudiado en muchos grupos étnicos para determinar su importancia en el estudio de enfermedades por exposición ambiental.

Las Glutation S-transferasas actúan en la segunda fase del metabolismo catalizando la conjugación del glutatión con sustratos electrofílicos, la acción futura por peptidasas y transferasas remueven los residuos glutámico y glicina, y con la

subsecuente acetilación de la cisteína, el glutatión conjugado puede ser degradado a ácido mercaptúrico, incrementando su solubilidad para finalmente ser excretado en la orina (Boylard y Chasseand, 1969; y Board *et al*, 1990).

Las GST detoxifican muchos sustratos que pueden ser sustancias carcinógenas y genotóxicas como el óxido de etileno, metil bromuro, diclorometano, ciclofosfamida y adriamicina (Longuemaux, 1999; y Allan, 2001).

La Glutathion S-transferasa P1 (GSTP1) pertenece a esta familia de genes y tiene dos polimorfismos de relevancia biológica: el primero es una transición A/G que cambia Isoleucina por Valina en el codón 105 y el segundo es una transición C/T que cambia Alanina por Valina en el codón 114. En ambos casos, el alelo mutado reduce la actividad de la enzima.

Varios estudios de Epidemiología Molecular han demostrado que existe una relación significativa entre el polimorfismo del gen GSTP1 y la susceptibilidad a desarrollar problemas de salud como el cáncer (Nakagawa *et al*, 1990; Puchalski y Fahl, 1990; Harries *et al*, 1996; Ryberg *et al*, 1997; Lee *et al*, 1997; Kristensen *et al*, 1998; Katoh *et al*, 1999; Hayes y Strange, 2000; Mitrumen *et al*, 2001).

Por todo lo anterior, fué de gran interés estandarizar la técnica para identificar el polimorfismo genético de GSTP1 en los codones 105 y 114; además, conocer cuáles eran las frecuencias genotípicas preliminares encontradas para el gen GSTP1 en la población del Sur - Occidente Colombiano estudiada y si dichas frecuencias eran similares o diferían de otras poblaciones.

En este documento se describe cómo se estandarizó el procedimiento para identificar el polimorfismo genético de GSTP1-I105V y A114V, utilizando las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el Polimorfismo de la Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLPs).

Esta técnica de biología Molecular mejorará el desarrollo investigativo por cuanto permite conocer molecularmente las diferencias genéticas de GSTP1 que existen entre individuos y poblaciones, para relacionarlas con efectos biológicos.

Además, se describe la frecuencia preliminar de distribución del polimorfismo genético de GSTP1-I105V en una población del Sur-Occidente Colombiano y su análisis comparativo con las frecuencias del mismo gen encontradas en otros grupos poblacionales.

Este trabajo de investigación forma parte de una fase de estandarización de técnicas de Epidemiología Molecular en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca para determinar las frecuencias alélicas de genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1 Y CYP2E1) que intervienen en el metabolismo de las sustancias psicoactivas.

En dicho estudio se pretenderá a futuro hacer un análisis del polimorfismo genético de los genes del metabolismo estudiados en conjunto y compararlos con la frecuencia de daños inducidos al material genético y determinar si la genotoxicidad de las drogas psicoactivas se encuentra modulada por los genes del metabolismo.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Existe una variedad de causas que han llevado a la contaminación ambiental a nivel mundial. El compromiso hacia la comunidad por parte del grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca (GITGC) nos llevó a investigar las sustancias tóxicas a las que actualmente estamos expuestos.

El grupo fue creado hace un poco más de diecisiete años por el departamento de biología y su objetivo principal es el de investigar cómo y bajo que condiciones las sustancias tóxicas afectan las poblaciones. Inicialmente se trabajó con pruebas *in vitro* y luego se introdujeron estudios de monitoreo genético en poblaciones expuestas (pruebas *in vivo*).

La comunidad científica internacional trabaja actualmente en estudios de Epidemiología Molecular, una nueva ciencia que estudia la influencia que tienen los factores genéticos y la exposición ambiental en el desarrollo de enfermedades.

La necesidad de obtener resultados más claros sobre la relación gen-ambiente llevó a introducir nuevas metodologías moleculares que permiten detectar poblaciones con condiciones genéticas desfavorables y que se supone son más susceptibles a tener problemas de salud. Todo esto para prevenir a la comunidad sobre los riesgos potenciales de adquirir enfermedades por exposición a sustancias cancerígenas.

El grupo de investigación realizó un estudio titulado “Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de las drogas psicoactivas en consumidores del Cauca”. Los resultados de este trabajo de investigación mostraron que la exposición a Sustancias Psicoactivas ilegales causa un incremento de daños genéticos en la población de drogadictos al compararlos con sus controles (Hoyos, *et al.* 2001).

En una segunda fase del estudio se estandarizaron de técnicas de epidemiología molecular utilizando el material genético de las poblaciones de estudio para conocer a futuro cómo la exposición a sustancias psicoactivas y la condición genética de las poblaciones podrían incrementar el riesgo de padecer una enfermedad.

Entre las técnicas moleculares que se estandarizaron para este trabajo se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen GSTP1-105 y GSTP1-114, y los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs).

La estandarización de la técnica de identificación del polimorfismo genético de GSTP1 servirá también para estudiar dicho gen en otros proyectos de investigación que ya se están desarrollando dentro del grupo de investigación.

### **3. IMPACTO**

Las frecuencias genotípicas preliminares de GSTP1 se relacionarán con la frecuencia de marcadores biológicos como Aberraciones Cromosómicas (AC), Micronúcleos (Mn) e Intercambio de Cromátides Hermanas (ICHs) evaluados en la primera fase de la investigación en la misma población. Con lo anterior se determinará si existe una asociación significativa entre el polimorfismo de GSTP1 y la respuesta biológica de la población expuesta a sustancias psicoactivas.

Los resultados de ésta investigación serán divulgados a la comunidad científica por medio de congresos y simposios; además, se espera que los resultados de éste trabajo sean publicados en una revista científica nacional.

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR

La epidemiología molecular es una ciencia que surge de la integración de la biología molecular y la epidemiología tradicional. Tiene como objetivos principales: evaluar mediante estudios descriptivos y analíticos las interacciones entre el individuo y el ambiente como causas de enfermedad, desarrollar estrategias de prevención para el control de enfermedades producidas por factores ambientales y evaluar el riesgo para la identificación de poblaciones susceptibles a desarrollar enfermedades (Perera, 1982).

Se sabe que muchas enfermedades son causadas por interacciones multifactoriales, especialmente entre factores genéticos y ambientales (Norppa, 1997; Perera, 1997 y 1998; y Au *et al*, 1999). Los factores medioambientales como el humo del cigarrillo, la dieta y sustancias contaminantes juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer, sin embargo, nuevas evidencias moleculares indican que grupos específicos caracterizados por su condición genética, etnicidad, edad o género pueden tener un riesgo incrementado ante la exposición a determinado agente tóxico como por ejemplo los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y las aminas aromáticas (Perera, 1997).

El cáncer es una de las enfermedades más estudiadas dentro de la Epidemiología Molecular. La identificación e incidencia de factores de riesgo ambiental y las alteraciones genéticas que se producen para el desarrollo del cáncer son de gran interés debido al alto costo de vidas humanas que se pierden en el mundo entero. Los muestreos epidemiológicos permiten establecer poblaciones de riesgo en donde se puede intervenir de manera preventiva y evitar la incidencia de enfermedades (Janice, 2002).

Las investigaciones enfocadas hacia el estudio de la relación exposición ambiental-enfermedad requieren del uso de biomarcadores, es decir, indicadores de eventos moleculares y celulares que ocurren en sistemas biológicos (Perera, 2002). Los biomarcadores se dividen en tres grupos: exposición, efecto y susceptibilidad.

Los biomarcadores de **exposición** detectan sustancias exógenas y/o sus metabolitos en los individuos; también detectan productos de la interacción entre un agente xenobiótico (extraño al organismo) y células o moléculas.

Los biomarcadores de **efecto** determinan la respuesta de un organismo a una exposición; definen si la exposición a genotóxicos ambientales induce daños genéticos tempranos precursores de un proceso de enfermedad .

Los biomarcadores de **susceptibilidad** son indicadores de la limitación heredada o adquirida de la habilidad de un organismo para responder a la exposición de una sustancia xenobiótica.

Varios biomarcadores de susceptibilidad usados en estudios de cáncer por exposición ambiental corresponden a genes del metabolismo que cumplen un papel específico en la activación/detoxificación de un agente genotóxico determinado; algunos ejemplos de estos genes pertenecen a las familias del Citocromo P450 (CYP), Paroxonasa (PON), Mieloperoxidasa (MPO), Hidrolasa Epóxida (EH), N-Acetil Transferasa (NAT) y Glutación S-Transferasa (GST) (Perera, 1998 y 2002; Husgafvel, 2002).

El polimorfismo en los genes del metabolismo juega un papel importante en el proceso de carcinogénesis, ya que modulan las diferentes respuestas biológicas ante la exposición de agentes genotóxicos ambientales (Ingelman, 2001).

En la tabla 1 se numeran algunos genes del metabolismo utilizados como biomarcadores de susceptibilidad en epidemiología molecular y su relación con algunas sustancias a las que las poblaciones se encuentran expuestas, de las cuales algunas (como hidrocarburos aromáticos policíclicos, plaguicidas, solventes orgánicos, etc) incrementan el riesgo de padecer una enfermedad.

Tabla 1. Función de algunos biomarcadores usados en la epidemiología molecular del cáncer.

<b>Biomarcador Molecular</b>	<b>Función</b>	<b>Bibliografía</b>
CYP450 (1A1, 2D6, 2E1)	Fase I. Tiene cerca de 80 sustratos diferentes (sustancias pequeñas e hidrofóbicas) Ej. Etanol, aldehidos, solventes orgánicos, N-nitrosaminas, compuestos aromáticos policíclicos, éteres, ácidos grasos, cafeína, etc.	Ronis et al, 1998.; Longuemaux et al, 1999.
MPO	Fase I. Activa aminas aromáticas, feniltioina, drogas anticonvulsivas y PAH. Presente en lisosomas de neutrófilos y monocitos (bactericida).	Trush <i>et al</i> ,1985; Corbett <i>et al</i> , 1988; Williams <i>et al</i> 1998; y Peña <i>et al</i> , 2001.
PON	Fase II. Detoxifica organofosforados y carbamatos	La Du, 2003.
GST (M1, T1, P1)	Fase II. Detoxifica PAH, plaguicidas, drogas anticáncer, acroleína, agentes quimioterapéuticos, etc. Protege la célula contra el estrés oxidativo. Activa haloalcanos y haloalquenos. Preferencia por los sustratos electrofílicos. Se relaciona con la susceptibilidad a padecer Cáncer.	Tan et al, 2000. Allan eta al, 2001; Piipari et al, 2003; Longuemaux et al, 1999. Tashiro, et al, 2001.
EH	Fase II. Detoxifica epóxidos, intermediarios inestables muy reactivos y PAH.	Groven <i>et al</i> , 1980; Carmichael <i>et al</i> , 1996.
NAT	Fase II. Se conjuga con una variedad de aminas aromáticas transfiriendo un grupo acetilo.	Longuemaux et al, 1999.

PAH: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

## 4.2 METABOLISMO Y BIOTRANSFORMACIÓN

Se conoce como **metabolismo** al conjunto de procesos bioquímicos por medio de los cuales se sintetizan todos los compuestos que conforman la célula y se produce la energía necesaria para las necesidades de la misma (Peña *et al.*, 2001).

Algunas enzimas metabólicas participan también en otro conjunto de reacciones que transforman los compuestos tóxicos exógenos (xenobióticos) o endógenos en metabolitos que se pretende sean fácilmente eliminados en la orina, en toxicología, a este proceso se le llama **Biotransformación**.

La Biotransformación de un tóxico consiste en convertir un xenobiótico no polar (insoluble en agua) en un compuesto soluble en agua que sea fácilmente eliminado del organismo, generalmente en la orina. La Biotransformación se agrupa en dos clases: fase I y fase II.

En la **FASE I** se presentan reacciones de oxidación haciendo al xenobiótico más hidrófilo y transformando sus grupos funcionales en sitios en los que se pueden llevar a cabo reacciones de la fase II; esto también se logra adicionando nuevos grupos funcionales como hidroxilo, amino y carboxilo, entre otros.

Posiblemente la oxidación es la reacción más común en esta fase y las enzimas encargadas de mediar en esta reacción son las Amino-oxigenasas y los Citocromos P450, ambas ubicadas en el retículo endoplásmico.

Las primeras oxidan aminas y compuestos sulfurados mientras que los Citocromos tienen doble función ya que poseen dos proteínas: una tiene función de reductasa (el NADPH dona iones hidruro y forma radicales libres cuando hay poco oxígeno en la célula) y la otra es una hemoproteína con actividad de oxigenasa (oxidando al xenobiótico). Los Citocromos también exponen grupos funcionales catalizando reacciones de desalquilación, desaminación y deshalogenación.

En la **FASE II** se presentan reacciones de conjugación donde se adiciona un grupo polar a los grupos funcionales del metabolito del xenobiótico; el resultado es el incremento de su solubilidad en el agua para ser finalmente excretado. Los donadores de los grupos polares tienen que ser compuestos de alta energía, ya que las reacciones de conjugación no son termodinámicamente favorables. Las principales reacciones que intervienen en esta fase son:

Glutathionización: catalizada por la Glutathion S-transferasa que adiciona glutathion (GSH) a través de su grupo sulfhidrilo (nucleofílico) a un carbón electrofílico del xenobiótico.

Sulfatación: las enzimas Sulfotransferasas transfieren un grupo sulfato a un grupo hidroxilo o amino del xenobiótico.

Glucuronidación: la UDP glucuronil transferasa adiciona un grupo glucuronil (del ácido glucurínico) en un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del xenobiótico.

Aminoacidación: unión peptídica entre un aminoácido (generalmente glicina) y un carboxilo en el xenobiótico.

Metilación: las metiltransferasas catalizan la transferencia de un grupo metilo (donado por la S-metil-metionina) a un hidroxilo, amino o sulfhidrilo del tóxico.

Debido a la variedad de los sustratos y de las enzimas que los transforman se pueden presentar reacciones que afectan la toxicidad de los xenobióticos cuando ingresan a un organismo; es así como varias enzimas de la fase I o II pueden bioactivar un xenobiótico volviéndolo más tóxico, algunos xenobióticos son detoxificados directamente en la fase II sin pasar por la fase I mientras que otros sólo son metabolizados por esta última.

La biotransformación de un xenobiótico depende del sustrato y de los genes involucrados en el proceso; los genes del metabolismo, junto con otros genes como los de respuesta inmune y de reparación están estrechamente ligados al desarrollo de enfermedades por exposición ambiental (Tabla 2).

Tabla 2. Genes de susceptibilidad y enfermedades medioambientales.

<b>Gen</b>	<b>Actividad</b>	<b>Exposición</b>	<b>Enfermedad</b>
CYP1A1	Activa	Humo cigarrillo	Cáncer de pulmón
NAT2	Detoxifica	Humo cigarrillo	Cáncer de vejiga
PON	Detoxifica	Plaguicidas	Toxicidad sistema nervioso central
PON	Factor de crecimiento	Humo cigarrillo	Paladar hendido
GST	Detoxifica	Humo cigarrillo	Cáncer de pulmón
ALAD	Biosíntesis	Plomo	Envenenamiento

Au, 2001

### 4.3 GLUTATION S-TRANSFERASAS

El mecanismo de detoxificación celular es de vital importancia en el mantenimiento de la salud, porque protege a la célula contra numerosos agentes tóxicos que se encuentran en el ambiente (Hayes y Strange, 2000).

La superfamilia del gen de la Glutation S-transferasa (GST) representa el mayor grupo de enzimas de detoxificación. Todas las especies eucariotas poseen múltiples isoenzimas GST unidas a la membrana y en el citosol (Kato *et al*, 1999).

Estas isoenzimas fueron descubiertas en el citosol del hígado de rata a comienzos de los años 60 por su habilidad para catalizar la conjugación del glutatión reducido (GSH) con sustancias tóxicas como el 1,2-dicloro-4-nitrobenceno y bromosulfoptalein (Hayes *et al*, 2000; Both *et al*, 1961 y Coombes *et al*, 1961).

La conjugación con el glutatión incrementa la solubilidad de las sustancias tóxicas en el agua. Como resultado, la acción futura por peptidasas y transferasas remueven los residuos glutámico y glicina; y con la subsecuente acetilación de la cisteína, el glutatión conjugado puede ser degradado a ácido mercaptúrico y excretado en la orina (Board *et al*, 1990; y Boyland y Chasseand, 1969).

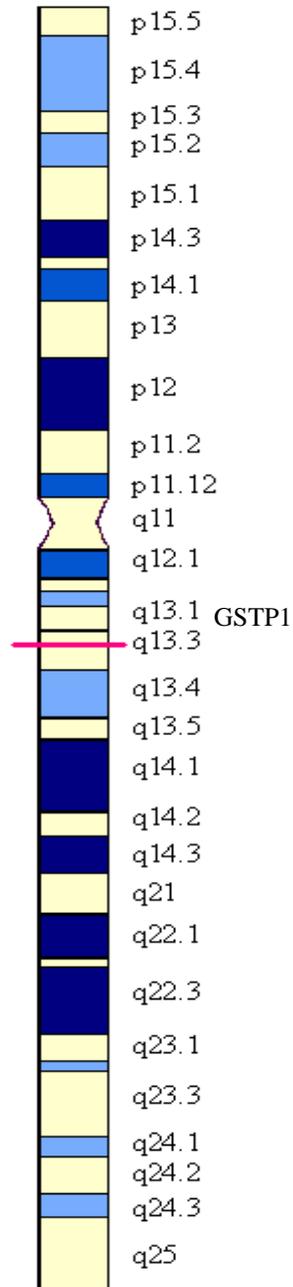
Existen dos subfamilias de la superfamilia del gen de la GST: la primera comprende proteínas microsomales, probablemente triméricas en su estructura y se encuentran involucradas en el metabolismo del ácido araquidónico (Jakobsson *et al*, 1999; Jakobsson *et al*, 1999; y Hayes *et al*, 2000.).

La segunda subfamilia comprende enzimas del citosol, solubles, diméricas en su estructura y son las principalmente involucradas en la biotransformación de los xenobióticos y endobióticos tóxicos (Hayes y Strange, 1995; Whalen y Boyer, 1998; y Hayes *et al*, 2000).

En humanos, ésta subfamilia comprende al menos 16 genes divididos en ocho clases denominadas Alfa, Kapa, Mu, Pi (P), Sigma, Teta, Zeta, y Omega (Hayes y McLellan, 1999; y Hayes *et al*, 2000).

Por pruebas de *hibridación in situ* se ha identificado al gen GSTP1 en el cromosoma 11 locus 11q13 (Figura 1) y al parecer tiene una copia o un pseudogen en el cromosoma 12 locus 12q13-14 (Moscow *et al*, 1988; ; Board *et al*, 1989; y Board *et al*, 1990). El tamaño aproximado del gen es de 2.841 bases (Human Gene Nomenclature database, 2002).

Figura 1. Ubicación del gen GSTP1 en el Cromosoma 11q13



Human Gene Nomenclature database, 2002.

El gen GSTP1 tiene dos polimorfismos genéticos de relevancia biológica: el primero se encuentra en el codón 105 donde el cambio de A por G introduce valina en la enzima en lugar de isoleucina; el segundo cambio se da en el codón 114 donde C es cambiada por T y se introduce valina en lugar de alanina; en ambos casos, el alelo mutante reduce la actividad de la enzima para catalizar el glutathion con 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (Ali-Osman *et al.* 1997).

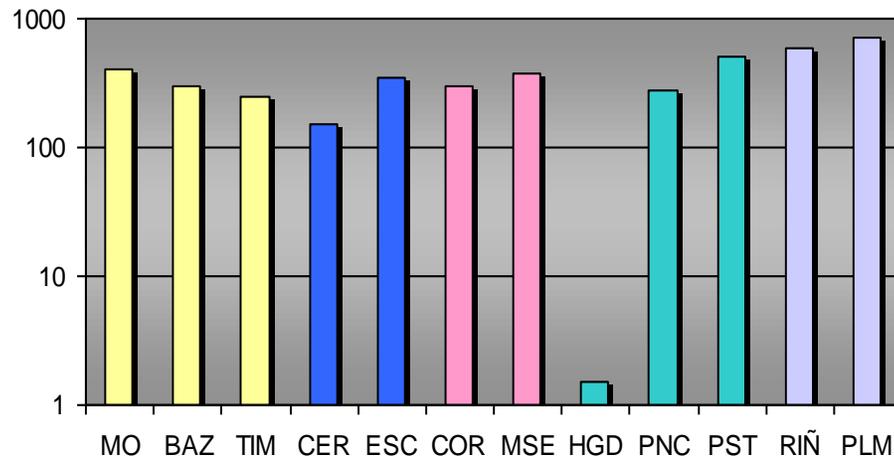
Dependiendo de los sitios de mutación encontrados se han identificado cuatro alelos en el gen GSTP1: el alelo tipo silvestre GSTP1\*A (Ile<sup>105</sup>-Ala<sup>114</sup>), el alelo GSTP1\*B (Val<sup>105</sup>-Ala<sup>114</sup>) que tiene una transición en el nucleótido +313; el alelo GSTP1\*C que además de la anterior tiene otra transición C/T en el nucleótido +341 (Val<sup>105</sup>-Val<sup>114</sup>); y el alelo GSTP1\*D (Ile<sup>105</sup>-Val<sup>114</sup>) con una transición C/T en el nucleótido +341 (Terrier *et al.*, 1990; Ali-Osman *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1998; y Strange *et al.*, 2000;).

La enzima Glutathion S-transferasa P1 (GSTP1) de la clase Pi metaboliza una gran variedad de sustancias, incluyendo químicos derivados del humo del cigarrillo tales como el benzo(a)pireno diol epóxido y acroleína (Hayes y Pulford, 1995), el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (Ali-Osman *et al.*, 1995) y metabolitos reactivos de agentes quimioterapéuticos como ifosfamida, busulfan, clorambucil, antraciclina, alcaloide vinca y epipodopilotoxin entre otros (Tew, 1994; y Allan *et al.*, 2001)

El polimorfismo genético de GSTP1 provoca diferencias en la actividad de su enzima. La condición mutante (Val) en los codones 105 y 114 alteran la estructura de la enzima y pueden afectar las estructuras  $\alpha$ -helical y/o superhelical. El cambio Ile – Val en el codón 105 causa un movimiento significativo en los aminoácidos cercanos al sitio activo (sitio H) creando una restricción estérica y restringiendo el acceso (por tamaño) al sitio activo. Como resultado, los sustratos de mayor tamaño pueden ajustarse mejor a la enzima cuando Ile<sup>105</sup> está presente, mientras que los sustratos pequeños se unen mejor al sitio activo en presencia de Val<sup>105</sup> (Ali-Osman *et al.*, 1995). Las enzimas con Val<sup>105</sup> tienen hasta siete veces mayor eficiencia para detoxificar Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos Diol Epoxidos que las enzimas con Ile<sup>105</sup>; en contraste, La enzima Val<sup>105</sup> es tres veces menos efectiva usando 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (Harris *et al.*, 1997). Val<sup>114</sup> produjo cambios de menor magnitud ya que se encuentra más alejada del sitio activo (hidrófobo) cercana a la región hidrofílica de la enzima (Ali-Osman *et al.*, 1995).

Esta enzima es expresada ampliamente en el tejido epitelial normal; además es abundante particularmente en el tracto respiratorio, digestivo y urinario (Kato *et al.*, 1999; Terrier *et al.*, 1990). En la figura 2 se indican las concentraciones de la enzima en diferentes órganos del cuerpo humano.

Figura 2. Expresión de la enzima GSTP1 en tejido normal humano.



Sistema inmune	Sistema nervioso	Músculo	Glándulas secretoras	Otros
MO: médula ósea	CER: cerebro	COR: corazón	HGD: hígado	RIÑ: riñón
BAZ: bazo	ESC: espina cordal	MSE: músculo	PNC: pancreas	PLM: pulmón
TIM: timo		Esquelético	PST: próstata	

Human Gene Nomenclature database, 2002.

#### 4.4 BIOLOGÍA MOLECULAR

La genética es la ciencia que estudia la herencia y a través de la historia se han utilizado enfoques experimentales en poblaciones, organismos, células y moléculas. Éste último enfoque sólo ha sido posible luego de que se descubriera al ADN como la macromolécula que transporta la información genética (estudio realizado por Avery, Macleod y Mc Carty en 1944) y posteriormente el modelo de la estructura del ADN por Watson y Crick en 1954.

A partir de estos estudios se desencadenó una serie de investigaciones que dieron origen a la Genética Molecular y permitieron conocer las bases moleculares del código genético, la transcripción, traducción y regulación génica; y finalmente utilizar la tecnología del DNA recombinante para beneficio del hombre (Klug W. y Cummings M., 1999).

Los estudios en Epidemiología molecular comprenden una serie de técnicas que utilizan el ácido desoxirribonucleico (ADN) para identificar en él polimorfismo de genes implicados en el metabolismo de xenobióticos.

Las técnicas que revolucionaron los estudios de análisis genético fueron la reacción en cadena de la polimerasa (conocida como **PCR** por sus siglas en inglés, **Polymerase Chain Reaction**) y los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (conocida como **RFLPs** por sus siglas en inglés, **Restriction Fragment Length Polymorphisms**).

**4.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):** la técnica de PCR se conoció por primera vez en 1983 cuando el Doctor en bioquímica Kary Mullis anunció las grandes posibilidades de la enzima polimerasa de una bacteria resistente a altas temperaturas (*Thermus Acuáticus*). Esta enzima, más conocida como Taq polimerasa es la esencia de la técnica de la PCR que permite amplificar hasta cien mil veces un ADN de una región seleccionada del genoma.

Esta técnica revolucionó completamente la Biología Molecular y en 1983, Science seleccionó la PCR como el principal desarrollo científico y la enzima Taq Polimerasa como la molécula del año. En 1993, Kary Mullis recibió por este descubrimiento el Premio Nobel de Química (Gomez, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa se lleva a cabo en una serie de ciclos, cada uno de los cuales incluye tres pasos:

**Desnaturalización:** inicialmente se requiere que el ADN se encuentre en forma de cadena sencilla y para esto se aplican temperaturas de 90 a 95°C produciendo una rotura en los puentes de hidrógeno intercatenarios (Figura 3). Como la molécula de ADN inicial es demasiado grande, es necesario que permanezca a esta temperatura por unos minutos, de lo contrario éste se renaturalizará rápidamente con su cadena complementaria y la hibridación de los cebadores no será eficiente (Láñez, 2003).

**Hibridación:** esta fase también llamada emparejamiento o annealing se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre los 40 y 60°C para favorecer la unión de los cebadores (o *primers* en inglés) a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar (Figura 3). La temperatura de annealing ( $T_m$ , “*melting temperature*”) es específica para cada gen y depende de factores como la longitud de los cebadores y su secuencia.

Para encontrar la  $T_m$  ideal para cada cebador se utiliza la fórmula:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

Además, es necesario hacer una serie de estudios experimentales. Si la  $T_m$  es muy baja el emparejamiento será inespecífico, de lo contrario el alineamiento será incompleto.

**Extensión:** se realiza a una temperatura de 72°C en la cual la *Taq* polimerasa alcanza su máxima actividad incorporando nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada (Figura 3).

El ciclo se repite de 26 a 35 veces y el producto amplificado final tendrá hasta un millón de copias del ADN molde. El termociclador es la máquina que hace posible pasar de una temperatura a otra reduciendo al mínimo el tiempo de rampa o tiempo transcurrido entre cada fase.

#### 4.4.2 Componentes de la PCR:

- **Buffer de amplificación y  $MgCl_2$ :** los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y  $MgCl_2$ . El  $MgCl_2$  influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones  $Mg^{2+}$  son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores de la enzima.

La concentración óptima de  $MgCl_2$  es de 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 mM de cada uno de los dNTPs. El Mg en exceso origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente del mismo hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.

- **Cebadores o primers:** son secuencias de oligonucleótidos complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. La longitud de cada cebador debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que a mayor longitud (30-35 bases) no aumenta el rendimiento y los *primers* cortos carecen de suficiente especificidad.

Ambos cebadores deben tener una  $T_m$  similar y la relación bases púricas y pirimidínicas debe ser 1:1 aproximadamente. La secuencia de los cebadores debe comenzar y terminar con 1o2 bases púricas y para evitar la formación de dímeros de cebadores es necesario comprobar que estos no contengan secuencias complementarias entre sí.

- **Desoxinucleótidos trifosfatos:** Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200  $\mu\text{M}$  para cada uno de ellos. La concentración de dNTPs y de  $\text{MgCl}_2$  va relacionadas ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la Taq polimerasa suficiente Mg como para incorporar dNTPs. Para una concentración de 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP se suele añadir  $\text{MgCl}_2$  a una concentración de 1.5 mM.

- **Taq-polimerasa:** las cantidades óptimas de *Taq polimerasa* necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25  $\mu\text{l}$  de volumen final de reacción. La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de  $\text{Mg}^{2+}$  y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad.

- **ADN molde o "template":** es el ADN del cual queremos amplificar un determinado fragmento. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de factores como la región a amplificar y la calidad del ADN. Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades de ADN de 5 ng dan buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la Taq polimerasa.

Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el que obtengamos o no un resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no. En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar purificar dicho ADN o diluir al máximo la muestra para disminuir contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR.

- **Ayudantes de la PCR:** son elementos que mejoran el rendimiento y la especificidad de la PCR y los mas conocidos son el **BSA**, el **DMSO** y el **glicerol**. En este estudio no se utilizó ninguna sustancia para mejorar la reacción de PCR.

Cuando se trabaja con muchas muestras de ADN se utiliza una mezcla madre, más conocida como *master mix* para facilitar y homogenizar las reacciones de PCR. La *master mix* consiste en adicionar en solo un vial los volúmenes de todos los reactivos (excepto el ADN) necesarios para todas las reacciones de PCR o RFLPs de un experimento; luego, se distribuye uniformemente la solución en los tubos de PCR y se continúa con el procedimiento.

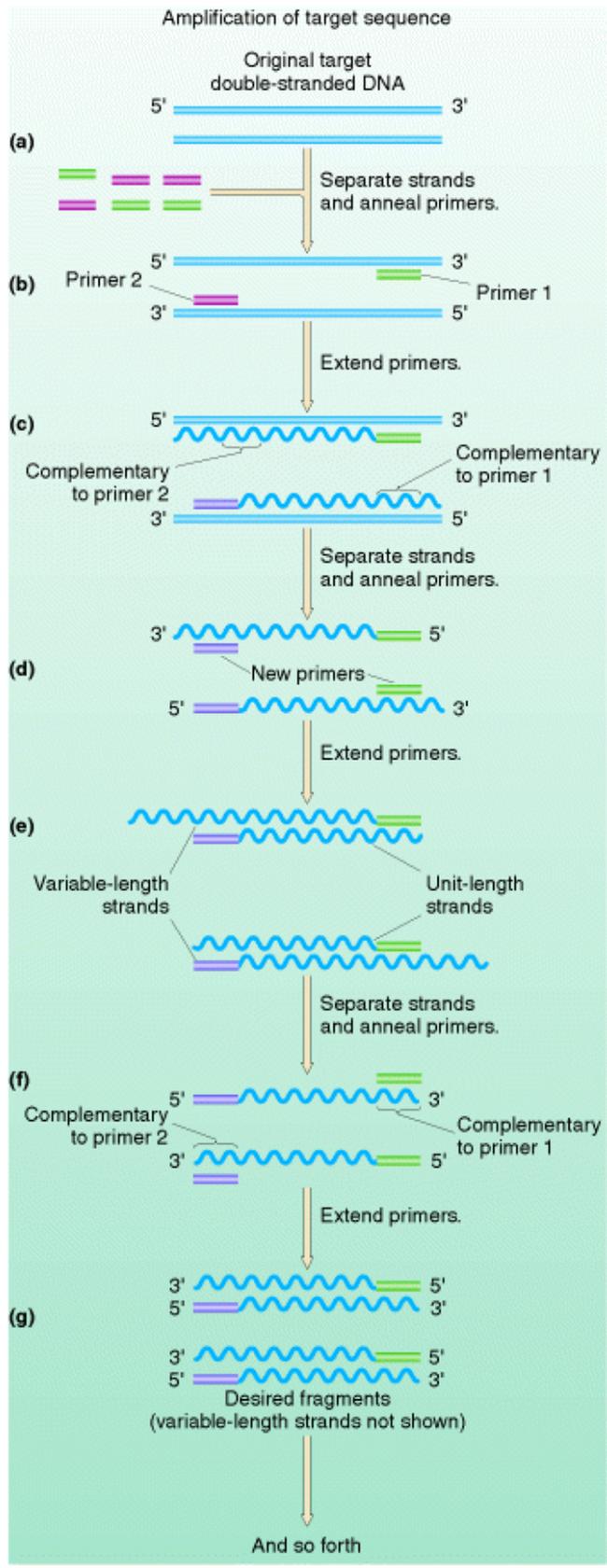
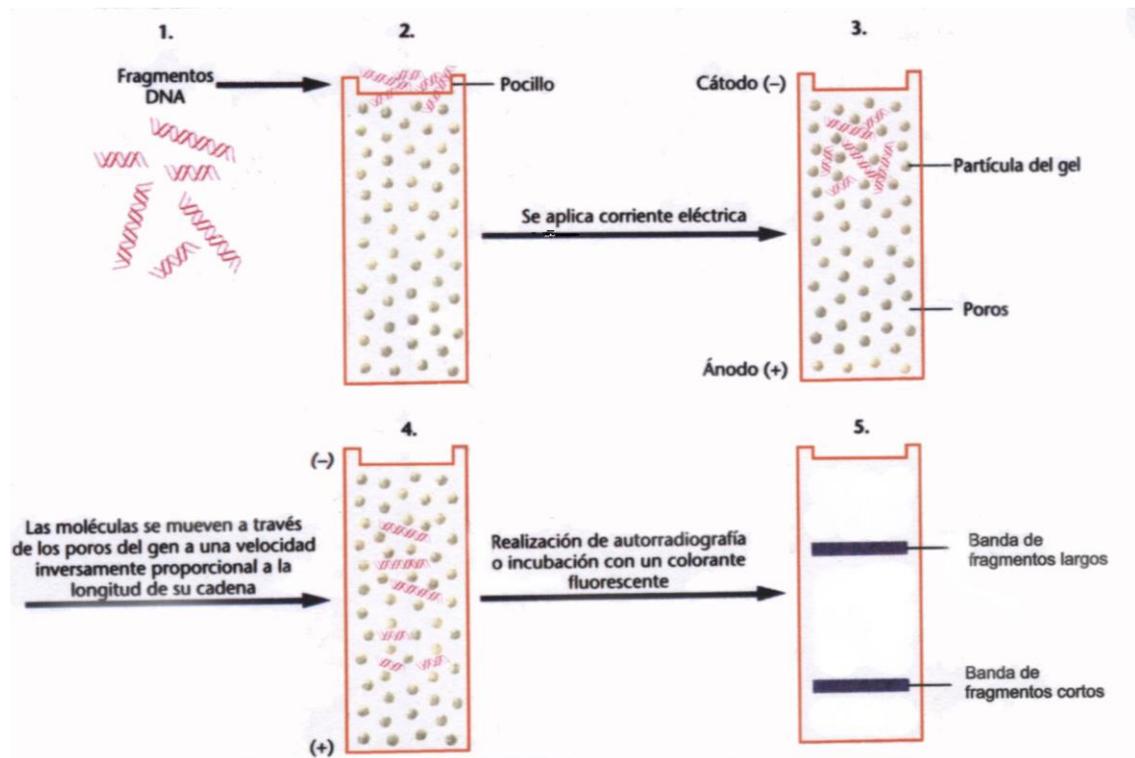


Figura 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa: (a) El ADN molde se calienta para la separación de sus cadenas, (b) Los dos primers o cebadores se hibridizan con las regiones flanqueantes de la región a amplificar, (c) Se da la extensión del cebador formando una copia del ADN bicatenario original, (d) En el segundo ciclo se separa la copia de ADN bicatenario y se hibridizan los cebadores en las cuatro regiones flanqueantes (en la gráfica sólo se observan dos de las cadenas), (e) Se da una extensión de los cebadores formandose cadenas de longitud variable y cadenas de la longitud deseada, (f) En un tercer ciclo los cebadores se unen a las cadenas de longitud deseada y (g) Se da la extensión de los cebadores originando cadenas bicatenarias de la longitud deseada. En la gráfica no se muestran las cadenas de longitud variable (Griffith, et al. 2000; y Láñez, 2003).

**4.4.3 Electroforesis:** uno de los métodos más utilizados para el estudio de ADN es la electroforesis, que ha revolucionado la investigación en genética molecular. La electroforesis consiste en la migración de moléculas cargadas al ser sometidas a un campo eléctrico (Figura 4). La técnica fue empleada por primera vez por Tiselius en 1937 para separar proteínas; y se fue perfeccionando utilizando diferentes matrices y soluciones para mejorar la sensibilidad, poder de resolución y versatilidad. La electroforesis se utiliza para separar mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas aportando un potente criterio de pureza; también para determinar peso molecular, punto isoelectrico y características acido-básicas (García, H.M. 2000).

Los productos de PCR son secuencias de ADN específicas; si la mezcla de PCR se realiza para amplificar un único segmento de ADN, su corrida en la electroforesis revela una sola banda ya que las moléculas tienen similar tamaño, forma y carga; si la mezcla de PCR se realiza para amplificar varios segmentos (PCR-Multiplex), la electroforesis de dicha mezcla revela varias bandas de diferente peso molecular.

Figura 4. Separación electroforética de una mezcla de fragmentos de ADN de 10 y 20 nucleótidos de longitud



Como se mencionó antes, el tamaño del poro de la agarosa es esencial para obtener una buena resolución de las bandas. Cuando las moléculas de ADN que se desean separar son grandes se utiliza un tamaño de poro grande y la concentración de agarosa disminuye (0.5 a 1%) mientras que para moléculas de ADN de tamaños moleculares pequeños se emplean concentraciones de agarosa de 1.5 a 3.5%.

Para formar el campo eléctrico es necesario aplicar un voltaje (60 a 120 voltios) y tener una solución conductora de electricidad; el Tris-Boro-EDTA (TBE) 1X es la solución más comúnmente usada para este fin. Otra sustancia muy utilizada es el Buffer de carga 6X que se mezcla con el ADN para facilitar su descenso y observación (por sus colorantes) mientras se aplica voltaje continuo.

El Bromuro de Etidio por su afinidad con el ADN es necesario para identificar las bandas por iluminación con luz ultravioleta. Finalmente se utiliza un marcador de peso molecular que contiene ADN con determinado número de bandas, cada una con un peso molecular conocido para tomarlo de referencia al comparar los productos amplificados (Madigan, et al. 1999).

**4.4.4 Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs):** un RFLP es una secuencia de ADN que posee un sitio de corte por una determinada enzima de restricción (Davidson College, 2001).

La tecnología del ADN recombinante surgió en 1971 cuando Hamilton Smith, Daniel Nathans y Walter Arber publicaron un artículo donde se describía el aislamiento en una bacteria de una enzima usada para cortar ADN vírico. Los RFLPs aparecieron cuando estas enzimas denominadas **endonucleasas de restricción** se utilizaron para cartografiar los genes humanos y han permitido grandes avances científicos en la genética moderna (Klug W. Y Cummings M., 1999).

Existen variaciones aleatorias de secuencias nucleotídicas que pueden formar o destruir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción; cuando esto sucede se altera el patrón de cortes que dichas enzimas producen en el ADN, es decir si uno o más nucleótidos (A, T, G o C) del sitio de restricción o “blanco” están alterados por algún cambio, deleción o inserción de base se pueden producir dos situaciones:

- Que se pierda el sitio de corte y la enzima que normalmente debe cortar el ADN no lo pueda realizar.

- Que se forme un sitio de restricción que normalmente no existe y el ADN sea cortado por la enzima.

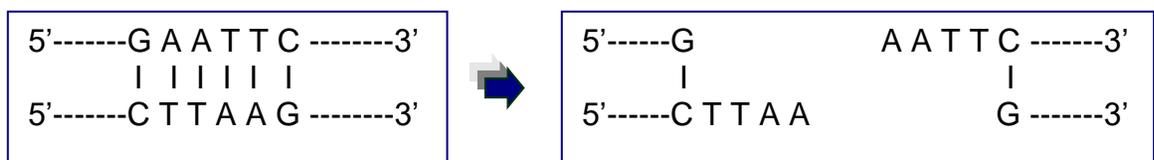
Si un sitio de restricción está presente en el ADN de un cromosoma y otro ausente en su homólogo se puede distinguir el carácter heterocigoto en el gen mediante técnicas de PCR y RFLPs. En el genoma humano se han detectado varios miles de RFLPs; estas variaciones se heredan de manera mendeliana como alelos codominantes y se distribuyen aleatoriamente en el genoma humano (Klug W. y Cummings M., 1999).

Lo anterior ha permitido que los RFLPs se usen como marcadores genéticos en el campo de la Epidemiología Molecular. Gracias a ellos se pueden detectar mutaciones puntuales en genes implicados en el metabolismo de sustancias genotóxicas y dichas mutaciones reflejan diferencias en la funcionalidad de la enzima que producen.

Las enzimas de restricción son aisladas de bacterias que evitan infecciones víricas al cortar el ADN invasor. Hay dos tipos de enzimas de restricción: las enzimas de **tipo I** que cortan las cadenas del ADN en una posición aleatoria y las enzimas de **tipo II** que cortan secuencias palindrómicas, o sea secuencias que en dirección 5'-3' se leen igual que en dirección 3'-5' de su cadena complementaria. Las enzimas de restricción pueden cortar ADN formando extremos "**pegajosos**" cuando el corte se produce de manera escalonada, o formar extremos "**romos**" cuando cortan el ADN en forma transversal (Figura 5)

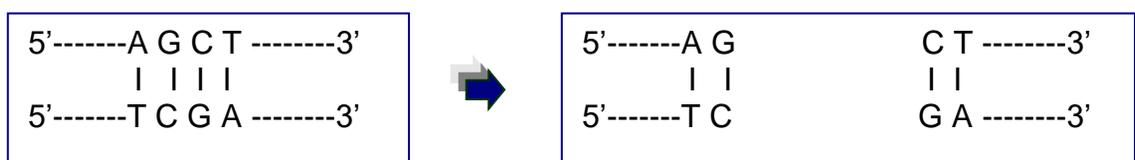
Figura 5. Enzimas de restricción a) EcoRI de *E.coli* con un patrón de corte pegajoso; b) AluI de *Arthrobacter luteus* con un patrón de corte romo.

a.



**Extremos Pegajosos**

b.



## Extremos Romos

Klug y Cummings, 1999.

Las enzimas BsmA I (de *Bacillus stearothermophilus*) y Aci I (de *Arthrobacter citreus*) son utilizadas para analizar el polimorfismo del gen GSTP1 en los codones 105 y 114 respectivamente. El patrón de corte de las enzimas BsmAI y Acil es pegajoso y las secuencias de los sitios de restricción que son cortadas por estas enzimas no son palindrómicas (endonucleasas de restricción de tipo I) (Figura 6). El buffer utilizado para ambas enzimas es el NEB 3 ya que mejora el porcentaje de actividad hasta el 100% (New England- BioLabs, 2003)

Figura 6. Enzimas de restricción con sus sitios de reconocimiento: a) BsmA I y b) Aci I. La letra N indica que cualquier base púrica o pirimidínica puede ubicarse en ese sitio y los subíndices indican la cantidad de bases.

a)

5'... G T C T C (N) <sub>1</sub> ^ ... 3'
3'... C A G A G (N) <sub>5</sub> ^ ... 5'

b)

5'... C^C G C ... 3'
3'... G G C^G ... 5'

New England BioLabs, 2003

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 GENERAL**

Estandarizar la técnica de identificación del polimorfismo genético de la glutathion S-transferasa P1 (GSTP1).

### **5.2 ESPECIFICOS**

**5.2.1** Estandarizar las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) para GSTP1.

**5.2.2** Establecer las frecuencias genotípicas preliminares del gen GSTP1 en la población de estudio y compararlas con las frecuencias de otras poblaciones reportadas en la literatura.

## **6. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN**

El Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca realizó un estudio titulado: "Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de las drogas psicoactivas en consumidores del Cauca". El estudio caso-control fue realizado con un grupo de personas expuestas a sustancias psicoactivas ilegales (SPI) y un grupo control.

El primer grupo pertenecía a la Fundación el SHADDAI, un centro de rehabilitación para drogadictos; los controles fueron obtenidos de diferentes instituciones educativas, la policía y el ejército en la ciudad de Popayán. La población de estudio en general pertenece al Sur-Occidente Colombiano.

Luego de explicar a la población en que consistía el trabajo investigativo a realizar y cuales eran sus objetivos, se realizó una encuesta para coleccionar información demográfica, hábito de fumar, estilo de vida, exposición ambiental a agentes genotóxicos e historia familiar y de salud. A partir de estos datos se seleccionó una población de estudio y con el consentimiento informado y voluntario se tomó una muestra de sangre, que sirvió para realizar los diferentes protocolos programados, incluido el de extracción de ADN. Ninguno de los individuos presentaba patologías o problemas congénitos.

Se obtuvieron muestras de ADN de linfocitos humanos por el método de "salting out" (Miller, 1988) y fueron almacenadas en 200  $\mu$ L de una solución Tris EDTA y guardadas en el refrigerador para posteriores estudios. Del banco de ADN obtenido a partir de dicho estudio se tomaron 65 muestras ADN genómico humano para estandarizar los polimorfismos genéticos de GSTP1.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

La mayoría de los reactivos utilizados en este trabajo de investigación provenían de casas comerciales (Sigma, BioLabs y Scientific Products) que los fabricaron como soluciones de trabajo listas para usar. Los reactivos que requirieron una preparación adicional se muestran a continuación.

#### 7.1.1 Reactivos para purificar ADN:

- Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA): se disolvieron 0.3 g de Tris HCl (Sigma T3253) en 150 mL de agua destilada estéril. Aparte se disolvieron 0.33 g de EDTA (Sigma E5134) en 70 mL de agua destilada estéril y se agregó NaOH hasta alcanzar un pH de 8.0. Se adicionaron 25 mL de la solución de EDTA a la solución de Tris HCl y se llevó a un pH de 7.5 con HCl. Se completó la solución con agua hasta 250 mL y se llevó a 75°C de temperatura antes de usarlo.

#### 7.1.2 Reactivos para PCR

- Cebadores o *primers*: fueron sintetizados por Genosys y se crearon soluciones stock y de trabajo a partir de los cebadores liofilizados tomando como base la información que aparece en sus viales de almacenamiento (Tabla 3) y los volúmenes y concentraciones que necesitamos para preparar la PCR (Tabla4).

Tabla 3. Información de los *primers* en los viales de almacenamiento.

Unidad	<i>Primers</i> GSTP1-105		<i>Primers</i> GSTP1-114	
	R	F	R	F
Peso molecular	5505	7452	6655	6616
Microgramos ( $\mu\text{g}$ )	250.6	309.2	421.6	461.5
Nanomoles	38.5	41.5	63.4	69.7
T° Media (Tm)	68.7	69.8	68.8	70.2
OD	8.1	10	12.7	15
$\mu\text{g}/\text{OD}$	31.3	30.9	33.1	30.7

New England BioLabs, 2003

La concentración final en la reacción de PCR fue de 0.4  $\mu\text{M}$  por cada primer y el volumen final de la reacción fue de 25  $\mu\text{L}$  de manera que se preparó una concentración de 10 $\mu\text{M}$  para usar un volumen de 1  $\mu\text{L}$  por reacción.

Tabla 4. Valores calculados para obtener soluciones stock y de trabajo.

Unidad	<i>Primers GSTP1-105</i>		<i>Primers GSTP1-114</i>	
	R	F	R	F
Picomoles	38500	41500	63400	69700
Solución stock ( $\mu\text{M}$ )	77	83	126.8	139.4
$\mu\text{L}$ Sln. Stock para crear Sln. Trabajo	32.5	30.1	19.7	17.9

### 7.1.3 Reactivos para electroforesis:

- TBE 10X (Tris-Boro EDTA) – Solución Madre: Se pesaron 7.45 g de EDTA (peso molecular: 372.2 g) y se completó con agua destilada estéril hasta 40 mL (EDTA 0.5M). En un recipiente aparte se diluyeron 108 g de base Tris con 700 mL de agua, una vez diluido se adicionaron lentamente 55 g de ácido bórico y los 40 mL de EDTA 0.5 M. Finalmente se aforó la solución con agua hasta un litro.

- Gel de agarosa 3%: se pesaron 1.2 g de agarosa nusive y se diluyeron en 40 mL de TBE 0.5X a 100°C de temperatura. Al enfriarse hasta 65°C aproximadamente se adicionaron 4  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio. Se vertió la solución en el molde (caja y peinetas) de la cámara de electroforesis.

## 7.2 CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se tomaron 10 muestras aleatorias del total de las poblaciones de estudio. Se realizó una dilución en agua con factor de dilución 1:100 y se tomó como blanco una solución de 10  $\mu\text{L}$  de TE y 990  $\mu\text{L}$  de agua. El blanco y cada muestra se introdujeron en el espectrofotómetro para medir la absorbancia a 260 y 280 nm para determinar la cantidad y pureza de los mismos. Para calcular la concentración y pureza de ADN se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$[\text{ADN } \mu\text{g/mL}] = 50 \times \text{Absorbancia a 260 nm} / \text{factor de dilución}$$

$$\text{Pureza de ADN} = \frac{\text{Absorbancia a 260 nm}}{\text{Absorbancia a 280 nm}}$$

Valores entre 1,7 y 2 son óptimos para trabajar en reacciones de PCR.

### 7.3 PURIFICACIÓN DE ADN

Cerca del 40% de las muestras tuvieron que ser purificadas porque la amplificación de ADN no resultó o fue deficiente. Para purificar estas muestras de ADN se siguieron las recomendaciones del kit de purificación utilizado (QIAamp DNA Blood Kit 100 No. Catálogo 51185) que contenía un buffer de extracción, un buffer de lavado, un tubo colector y una columna con afinidad iónica para ADN.

### 7.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El polimorfismo del gen GSTP1 (105 y 114) fue determinado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) de acuerdo con Mengon *et al*, 1998. Los primers que se utilizaron en PCR (a una concentración de 5  $\mu$ M o 5 pmol/ $\mu$ L) fueron:

**GSTP1-105 :** P1-105-F – 5'-CTC TAT GGG AAG GAC CAG CAG GAG-3'

P1-105-R – 5'-CAA GCC ACC TGA GGG GTA AGG-3'

**GSTP1-114:** P1-114-F – 5'-GTT GTG GGG AGC AAG CAG AGG-3'

P1-114-R – 5'-CAC AAT GAA GGT CTT GCC TCC C-3'

Todos los reactivos usados en la amplificación fueron previamente resuspendidos en vortex. Éste es un paso esencial para que la PCR tenga buenos resultados. Para los polimorfismos GSTP1-105 y GSTP1-114 se elaboraron *master mix* generalmente para 12 muestras con volúmenes que se muestran en la Tabla 5.

La mezcla madre contenía todos los reactivos adicionados en orden de acuerdo a la tabla 5 a excepción del ADN (1,5  $\mu$ L). Esta mezcla se dividió en volúmenes iguales (23,5  $\mu$ L) para los tubos de PCR previamente rotulados; y finalmente se adicionó a cada uno de ellos la muestra de ADN resultando un volumen final de 25  $\mu$ L.

Tabla 5. Reactivos utilizados en la reacción de PCR.

Reactivo	Concent. Trabajo recomendada	Concent. Trabajo Utilizada	Volumen 1 muestra ( $\mu$ L)	Volumen 12 muestras ( $\mu$ L)
Agua	-	-	14.1	169.2
DNTPs	200 $\mu$ M de cada nucleótido	200 $\mu$ M de cada nucleótido	0.5	6
**Primer 105-R	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1	24
**Primer 105-F	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1	24
**Primer 114-R	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1	24
**Primer 114-F	10 $\mu$ M	10 $\mu$ M	1	24
Buffer 10X	1X	1X	2.5	30
MgCl <sub>2</sub>	0.5 – 2.5mM	2.5mM	2	24
Taq polimerasa	1unid./25 $\mu$ L	0.4 unid./25 $\mu$ L	0.4	4.8
*DNA	0,02ng – 0,02 $\mu$ g/ $\mu$ L	0,018 $\mu$ g/ $\mu$ L	1.5	-
Total	-	-	25	282/12 = 23.5

Concentraciones recomendadas por Coyne et al, 2001 y Menegon *et al*, 1998.

\*Concentración final de ADN

\*\*La PCR se realiza de forma independiente para cada polimorfismo (GSTP1-105 y GSTP1-114)

La mezcla madre contenía todos los reactivos adicionados en orden de acuerdo a la Tabla 5 a excepción del ADN (1,5 $\mu$ L). Esta mezcla se dividió en volúmenes iguales (23,5 $\mu$ L) para los tubos de PCR previamente rotulados; y finalmente se adicionó a cada uno de ellos la muestra de ADN resultando un volumen final de 25 $\mu$ L.

Los tubos con la reacción de PCR se llevaron a un termociclador Gene AMP PCR System 2700 (Applied Biosystems, Singapur) previamente calibrado en las siguientes condiciones: Temperatura inicial: 95°C por 10 minutos; 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 63°C por 45 segundos y 72°C por 1 minuto; y Temperatura final: 72°C por 10 minutos. El termociclador tardó cerca de 2 horas en cumplir con las condiciones de temperatura de la PCR.

## 7.5 ELECTROFORESIS DE PCR

Se mezclaron 10 $\mu$ L del producto amplificado con 1 $\mu$ L de buffer loading 6X. y se llevó la solución a cada pozo del gel de agarosa, previamente cubierto de buffer TBE 0,5X en la cámara electroforética. 5 $\mu$ L del marcador de peso molecular se adicionaron en el primer pozo del gel. La fuente de poder fue calibrada a 80 voltios durante 40 minutos. Las bandas del producto amplificado contenidas en el gel fueron observadas bajo una lámpara de luz ultravioleta (UV). Se confirmó la presencia de bandas de 193pb para GSTP1-105 y 217pb para GSTP1-114.

## 7.6 FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN DE LONGITUD POLIMÓRFICA (RFLPs)

Para los dos polimorfismos (GSTP1-105 y GSTP1-114) se realizaron *master mix* generalmente para 12 productos amplificados como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Reactivos utilizados en RFLPs

Reactivo	GSTP1-105 ( $\mu$ L)	GSTP1-114 ( $\mu$ L)	Master mix 12 muestras ( $\mu$ L)
Producto amplificado	12	12	-
Enzimas de restricción	1 $\mu$ L (5U) BsmA1	1 $\mu$ L (10 U) Acil	12
Buffer NEB3 1X	3	3	36
BSA	0.2	-	2.4 (para P1-105)
Agua	-	15	180 (para P1-114)
Total	16.2	31	-

Para GSTP1-105 se adicionaron 4,2 $\mu$ L de la *master mix* sobre cada producto amplificado; se resuspendió con vortex y se mantuvieron a 55°C por toda la noche.

Para GSTP1-114 se adicionaron 19 $\mu$ L de la *master mix* sobre cada producto amplificado; se resuspendió con vortex y se mantuvieron a 37°C por toda la noche.

## 7.7 ELECTROFORESIS PARA RFLPs

Se mezclaron 10 $\mu$ L del producto digerido con 1 $\mu$ L de buffer loading 6X. y se llevó la solución a cada pozo del gel de agarosa, previamente cubierto de buffer TBE 0,5X en la cámara electroforética. 5 $\mu$ L del marcador de peso molecular se adicionaron en el primer pozo del gel.

La fuente de poder fue calibrada a 80 voltios durante 40 minutos. Las bandas del producto digerido contenidas en el gel de agarosa fueron observadas bajo una lámpara de luz ultravioleta (UV). Se confirmó la presencia de bandas como se muestra en la Figura 7.

Figura 7. Representación esquemática de la presencia de bandas en el gel de agarosa bajo una lámpara de luz UV.

GSTP1						
bp	105			114		
	Ile/Ile	Ile/Val	Val/Val	Val/Val	Val/Ala	Ala/Ala
217				—	—	
193	—	—				
123					—	—
110		—	—			
96					—	—
88		—	—			

## 7.8 REGISTRO DE DATOS

Una hoja de registro (Ver anexos 2 y 3) se usó para anotar los datos del polimorfismo genético del gen GSTP1. Para el polimorfismo GSTP1-105 se registraron tres condiciones genotípicas: Ile/Ile (una banda de 193pb), Ile/Val (tres bandas de 193, 110 y 88pb) y Val/Val (dos bandas de 110 y 88pb). Para el polimorfismo GSTP1-114 se registraron tres condiciones genotípicas: Ala/Ala (dos bandas de 123 y 96pb), Val/Ala (tres bandas de 217, 110 y 96 pb) y Val/Val (una banda de 217pb).

**7.8.1 Criterios para el registro de bandas:** para registrar la presencia de bandas en el gel se cumplieron con los siguientes requisitos:

- Las bandas correspondían al peso molecular esperado, y el señalado por el marcador de peso molecular.
- Las bandas fueron claras y nítidas.
- No se admitieron muestras con bandas diferentes a las esperadas.
- Cuando las bandas no se observaron claras se repitió el experimento para esa muestra.
- Las bandas estaban claramente separadas en los productos digeridos por endonucleasas de restricción que cortaron el ADN.

## 7.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias del gen GSTP1 fueron analizadas como variables dicotómicas así: para GSTP1-I105V: I/I y I/V+V/V; y para GSTP1-A114V: A/A y A/V+V/V. La prueba de similitud entre las frecuencias encontradas en este estudio y las frecuencias de otras poblaciones se hizo con base en el intervalo de confianza (IC) del 95% ( $p < 0,05$ ).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DE ADN

En la Tabla 7 se observa que la absorbancia promedio de ADN a 260 nm fue de 0.0621  $\pm$  0.0133. Aplicando las fórmulas para obtener la concentración promedio de las muestras de ADN se tiene:

$$[\text{ADN}] = \frac{0,0621}{1/100} \times 50 = 310,5 \mu\text{g/mL} = \mathbf{0,3105 \mu\text{g}/\mu\text{L}}$$

Con base en la lectura de la absorbancia a 260 nm de las 10 muestras de ADN analizadas se presume que para las reacciones de PCR se trabajó con una concentración final aproximada de 18,6 ng/ $\mu\text{L}$  de ADN; dicha concentración se encuentra dentro del rango recomendado por Coyne *et al* (2001) (entre 0,02 ng y 20 ng/ $\mu\text{L}$ ); sin embargo los estudios de análisis polimórfico del gen GSTP1 reportan concentraciones inferiores a la utilizada en este trabajo (aprox. 2ng/ $\mu\text{L}$ ) por lo cual se considera que la estandarización para GSTP1 puede mejorarse a futuro incrementando la pureza y reduciendo la concentración del ADN, ya que lo ideal en biología molecular es trabajar con pequeñas cantidades sin perder la confiabilidad de los resultados.

Tabla 7 : Lectura en espectrofotómetro a 260 y 280nm e índice de pureza de las muestras de ADN.

Muestra	Promedio Absorbancia a 260 nm $\pm$ DE*	Promedio Absorbancia 280 nm $\pm$ DE*	Índice de Pureza: A.260 / A.280 nm $\pm$ DE*
ADN	0,061 $\pm$ 0,013	0,0357 $\pm$ 0,017	1,908 $\pm$ 0,54

\* Desviación estándar

El índice promedio de pureza de ADN fue de  $1,908 \pm 0,54$  (Tabla 7) y se encuentra en el rango de calidad óptima recomendado (1,7 – 2,0) para reacciones de PCR. La desviación estándar ( $\pm 0,54$ ) está indicando que existen datos que no se encuentran en el rango de calidad recomendado y se puede asumir que la calidad del ADN es muy variable en las muestras analizadas. Lo anterior puede dar la explicación de por que el 40% del total de las muestras de ADN exigieron un proceso adicional de purificación para lograr óptimos resultados.

La cantidad de ADN a utilizar en la técnica de PCR tiene un rango muy amplio de aceptación, de manera que es fácil obtener concentraciones adecuadas para trabajar; sin embargo, la calidad del ADN es un requisito más difícil de adquirir ya que la contaminación, especialmente por proteínas, es muy común en las técnicas de extracción de ADN.

La contaminación del ADN interfiere en la amplificación por cuanto no permite que la molécula de ADN abra sus cadenas con facilidad y se introduzca toda la maquinaria necesaria para comenzar la reacción en cadena de la polimerasa.

La extracción de ADN es un paso fundamental para que su calidad sea óptima; actualmente existen técnicas como las de columnas con afinidad iónica por el ADN, que son un buen tamizaje para evitar la contaminación.

## **8.2 POLIMORFISMO DE GSTP1**

La técnica de identificación del polimorfismo genético de GSTP1-I105V mostró unas bandas de excelente calidad. Los mejores resultados se observaron al utilizar una *master mix*, es decir, la mezcla de todos los reactivos (excepto el ADN) de la PCR de varias muestras para luego ser dividido equitativamente en los tubos de PCR y finalmente adicionar el ADN; de manera semejante se realizaron *master mix* para RFLPs obteniendo buenos resultados. La *master mix* es un procedimiento que optimiza los resultados de la PCR y RFLPs ya que asegura que la concentración de los reactivos es igual para todas las muestras, reduce tiempo, costos y fuente de error en la manipulación de los reactivos.

Durante los ensayos existieron diferencias en la nitidez de las bandas entre las muestras de estudio, posiblemente causado por la diferencia en la calidad del ADN extraído por "Salting Out". Para asegurarse de que la técnica diera resultado se hizo una repetición de varias muestras de ADN y al compararlas no se presentó ninguna disparidad.

Al menos dos personas estuvieron presentes en la lectura de las bandas para la identificación del polimorfismo de GSTP1-I105V; se repitió el experimento para dos

muestras de ADN porque el producto amplificado dio bandas inespecíficas. Inicialmente se trabajó con un volumen total de PCR de 50  $\mu$ L pero dada la efectividad del procedimiento fue posible reducir el volumen de la PCR a 25  $\mu$ L sin perder la calidad de las bandas.

Las concentraciones de los reactivos utilizados para el estudio fueron óptimas y no fue necesario calibrar (en el termociclador) la temperatura de alineamiento (*aniling*). Las enzimas de restricción utilizadas (BsmAI y Acil para GSTP1-105 y GSTP1-114 respectivamente) funcionaron perfectamente ya que se obtuvieron las bandas esperadas y todas las posibles variantes polimórficas.

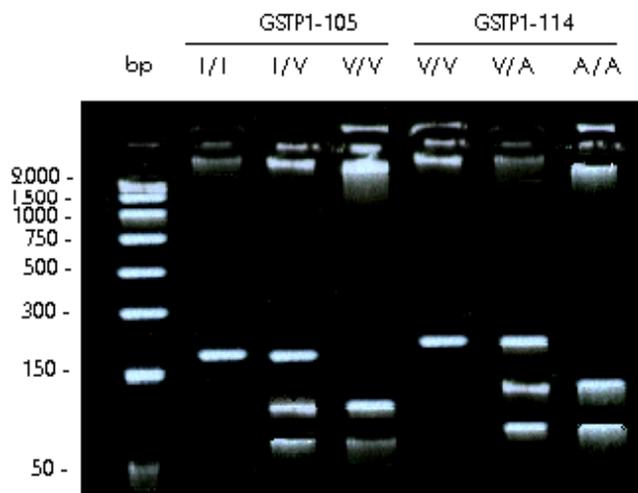
La electroforesis para las mezclas de PCR y RFLPs se realizó a 80 voltios para que las muestras de ADN se desplacen por la matriz de agarosa sin dejar un rastro por su recorrido y sin el efecto “sonrisa”, que se presenta cuando, al aplicar voltajes mayores, la región central se desplaza más rápido que los extremos de la banda.

La concentración del gel de agarosa es muy importante para obtener una buena resolución de bandas. Dado que el peso molecular de las bandas que se esperaban obtener se encontraban entre 217 pb y 88 pb, el gel de agarosa se realizó a una concentración alta (3%) para que el diámetro del poro disminuya, se dificulte el paso del ADN por la matriz y finalmente las bandas se separen adecuadamente.

La Figura 8 muestra claramente la separación de bandas con los pesos moleculares esperados para cada una de ellas así: para el polimorfismo GSTP1-105 hay una banda a 193 pb que corresponde al genotipo normal (Ile/Ile), dos bandas de 110 pb y 83 pb para el genotipo mutado (Val/Val) y tres bandas de 193 pb, 110 pb y 83 pb para el genotipo heterocigoto (Ile/Val).

En el polimorfismo GSTP1-114, para el genotipo normal (A/A) se presentan dos bandas de 123 pb y 94 pb; para el genotipo mutante (V/V) una sola banda de 217 pb y para el genotipo heterocigoto (A/V) tres bandas de 217 pb, 123 pb y 94 pb.

Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa con el polimorfismo genético de GSTP1.



El tamaño de la población de estudio ( $n = 65$ ) no fue lo suficientemente grande para estimar las frecuencias genotípicas (normal, heterocigoto y mutante) del polimorfismo genético del gen GSTP1-105 y más aún para el GSTP1-114 (porque su frecuencia de mutación es reducida).

Para comparar los resultados obtenidos con otras poblaciones se trabajó con las frecuencias del genotipo normal y con el genotipo que tiene al menos una mutación (heterocigoto y homocigoto mutante) mencionado aquí como alelo mutante.

Los datos de frecuencias obtenidos en este trabajo son sólo resultados preliminares, para encontrar las frecuencias genotípicas de GSTP1 es necesario incrementar el tamaño de la muestra de estudio a 200 o más muestras de ADN para que los resultados tengan mayor poder estadístico.

Tabla 8. Frecuencias genotípicas de GSTP1-I105V en la población estudiada.

<b>GSTP1</b>	<b>Población <math>n</math> (%)</b>
Ile/Ile	26 (40)
Ile/Val	33 (51)
Val/Val	6 (9)
Ile/Val + Val/Val	39 (60)

La frecuencia del alelo mutante (I/V + V/V) para GSTP1-105 es del 60% en las muestras analizadas (Tabla 8); con base en este dato se puede estimar que la frecuencia preliminar del alelo mutante se encuentra entre el 48 y 72% de la población estudiada (IC del 95%), error estándar de 0,061.

La frecuencia preliminar del alelo mutante antes mencionado no difiere significativamente de las frecuencias encontradas en otras poblaciones como la Noruega, Euro-americana, Afro-americana, Alemana, Australiana y Portuguesa; sin embargo si difiere de poblaciones como la Taiwanesa, Francesa, Japonesa, Inglesa, Caucásica e Italiana (Tabla 9).

Es de esperar que por cercanía genética haya una proximidad relevante entre las frecuencias del alelo mutante GSTP1-105 de las poblaciones Euro-americana y Afro-Americana y la frecuencia preliminar de la población de este estudio, ya que éste último pertenece a la población Colombiana y a su vez a la Latino-americana (Tabla 9).

Grupos poblacionales como los Taiwaneses, Franceses, Japoneses, Ingleses, Caucásicos e Italianos que no se relacionan con el origen de la mezcla étnica Latino-americana, tienen frecuencias alélicas de GSTP1-105 muy distantes de la población estudiada.

Tabla 9. Frecuencias genotípicas del gen GSTP1-105 en poblaciones humanas.

<b>POBLACIÓN</b>	<b>n</b>	<b>I/I (%)</b>	<b>I/V + V/V (%)</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>
P. de estudio	65	40	60	-
*Noruega	297	51,5	48,5	Ryberg, <i>et al</i> , 1997
*Euro-americana	287	42,5	58,5	Watson, <i>et al</i> , 1998
*Afro-americana	137	35	65	Watson, <i>et al</i> , 1998
Taiwanesa	116	67,2	32,8	Watson, <i>et al</i> , 1998
Francesa	211	69	31	Longuemaux <i>et al</i> , 1999
Japonesa	122	79,2	24	Katoh, <i>et al</i> , 1999
Inglesa	178	67	33	Welfare, <i>et al</i> , 1999
*Alemana	64	50	50	Stanulla, <i>et al</i> , 2000
*Australiana	292	46	54	Joanne, <i>et al</i> , 2000
Caucásica	482	55,3	44,7	Mitrumen, <i>et al</i> , 2001
Italiana	21	66,55	33,45	Tozzi, <i>et al</i> , 2002
*Portuguesa	141	43.3	56.7	Jerónimo <i>et al.</i> , 2002

Tabla 10. Frecuencias genotípicas de GSTP1-A114V en la población de estudio.

<b>GSTP1</b>	<b>Población n (%)</b>
Ala/Ala	16 (57)
Ala/Val	11(39,3)
Val/Val	1(3,6)
Ala/Val + Val/Val	12 (43)

La frecuencia del alelo mutante (A/V + V/V) para GSTP1-A114V es del 43% en las muestras analizadas (Tabla 10); con base en este dato se puede estimar que la frecuencia preliminar del alelo mutante se encuentra entre el 34 y 52% de la población estudiada (IC del 95%), error estándar de 0,094.

Tabla 11. Frecuencias genotípicas de GSTP1-A114V en poblaciones humanas.

<b>POBLACIÓN</b>	<b>n</b>	<b>A/A (%)</b>	<b>A/V + V/V (%)</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>
P. de estudio	28	57	43	-
Euro-americana	287	82	18	Watson, <i>et al</i> , 1998
Afro-americana	137	95	5	Watson, <i>et al</i> , 1998
Francesa	211	100	0	Longuemaux <i>et al</i> , 1999
Inglesa	178	90	10	Welfare <i>et al</i> , 1999
Alemana	64	75	25	Stanulla, <i>et al</i> , 2000
Italiana	21	93,7	6,3	Tozzi, <i>et al</i> , 2002

La frecuencia preliminar del genotipo mutante antes mencionada no se asemeja significativamente (I.C.95%,  $p > 0,05$ ) a ninguna de las frecuencias poblacionales para el gen GSTP1-A114V reportadas en la Tabla 11.

Sin una aparente cercanía genética entre la población de este estudio y las poblaciones de Noruega, Alemana, Australiana y Portugal, la frecuencia preliminar del alelo mutante para GSTP1-I105V es similar en todos los casos; por otro lado, aunque las poblaciones Euro-Americana y Afro-Americana se acercan genéticamente a la población de este estudio, las frecuencias del alelo mutante para GSTP1-A114V no son similares.

Lo anterior puede explicarse porque el tamaño de la muestra de estudio de este trabajo y el de varias investigaciones citadas es reducido; además, las características de selección de los sujetos de estudio podrían estar cegadas (en cuanto a edad, sexo y estado de salud) a grupos particulares, ya que los estudios son de tipo caso-control.

La literatura reporta que el gen GSTP1-105 se encuentra asociado a múltiples tipos de cáncer como cáncer de pulmón (Miller, *et al*, 2002), cáncer de seno (Maugard, *et al*. 2001; Mitrumen, *et al*. 2001; Vessela, *et al*. 1998; y Gudmundsdottir, *et al*. 2001), cáncer de cabeza y cuello (Olshan, *et al*. 2000), cáncer de vejiga, testículo y próstata (Harries, *et al*. 1997), cáncer de riñón (Longuemaux, *et al*. 1999) y leucemia (Allan, *et al*. 2001).

Sin embargo, existen otros estudios que no indican asociación alguna entre cáncer y el polimorfismo genético de GSTP1-105, por ejemplo: cáncer de esófago (Tan, *et al*. 2000), adenocarcinoma de próstata (Jerónimo, *et al*. 2002), cáncer colorectal (Welfare, *et al*. 1999), cáncer de ovario (Spurdle, *et al*. 2001), cáncer de seno (Zhao, *et al*. 2001), cáncer de laringe (Jourenkova, *et al*. 1999) y cáncer epitelial, oral, pulmonar, gástrico, colorectal y urotelial (Kato, *et al*, 1999).

En la literatura revisada se encontraron pocas asociaciones entre algún tipo de cáncer y el polimorfismo para GSTP1-114; un estudio realizado por Park, *et al*, en el 2000 reportó un incremento en el riesgo de cáncer oral en individuos con el genotipo mutado para la combinación de los polimorfismos GSTP1-105 y GSTP1-114.

Por el contrario, Welfare en 1999 no mostró diferencias significativas entre las frecuencias de GSTP1-105 y GSTP1-114 y la predisposición al cáncer colorectal en personas del nor-este de Inglaterra. Un estudio similar con la población Norte-Americana realizado por Watson, *et al* en 1998 no mostró ninguna asociación entre los polimorfismos GSTP1 (I105V y A114V) y el riesgo de padecer cáncer colorectal o de pulmón.

Lo anterior indica una disparidad en la comunidad científica acerca del papel que cumple el gen GSTP1 en el riesgo de adquirir cáncer. Algunos estudios que reportan una asociación entre el polimorfismo GSTP1-105 y el cáncer muestran un nivel de significancia moderado, pero al combinarlo con genotipos mutantes de otros genes como GSTM1, GSTT1, NAT, CYP2E1 o CYP1A1 el nivel de significancia se incrementa y se considera que el riesgo de padecimiento de cáncer es mayor (Olshan, *et al*. 2000; Longumaux, *et al*. 1999; De Roos, *et al*, 2003 y Miller, *et al*, 2002).

Por el contrario, estudios en cáncer de seno realizados por Vessela, *et al*. 1998 y Gudmundsdottir, *et al*. 2001 no reportan un incremento del riesgo de cáncer con la combinación de GSTP1-105 con otros genotipos; conclusiones similares en un estudio de leucemia fueron reportados por Allan *et al* en el 2001.

En los estudios de Epidemiología molecular del cáncer por exposición ambiental es importante tener en cuenta el juego de genes que está interactuando en el metabolismo de xenobióticos, ya que la sumatoria de condiciones genéticas desfavorables puede ocasionar un efecto sinérgico de problemas de salud.

A futuro se espera que las frecuencias del polimorfismo genético de GSTP1 encontradas en la población del sur-occidente colombiano se puedan comparar con la frecuencia de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos; y la frecuencia de otros genotipos como GSTM1, GSTT1 y CYP2E1 evaluados previamente en la misma población. Lo anterior para determinar si el polimorfismo genético de GSTP1 incrementa el riesgo del padecimiento de una enfermedad como el cáncer y si ese incremento se encuentra asociado a la combinación de otros genotipos implicados en el metabolismo de xenobióticos.

## CONCLUSIONES

La técnica de identificación del polimorfismo genético de la Glutathion S-transferasa P1 se estandarizó satisfactoriamente en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. Esta técnica se aplicará a futuros proyectos de investigación para tratar de encontrar una asociación entre el polimorfismo de GSTP1 y la susceptibilidad a padecer problemas de salud por exposición ambiental.

La técnica de identificación del polimorfismo genético de GSTP1-I105V mostró unas bandas de excelente calidad. Los mejores resultados se observaron al utilizar *master mix*, un procedimiento que optimiza los resultados de la PCR y RFLPs ya que asegura que la concentración de los reactivos es igual para todas las muestras, reduce tiempo, costos y fuente de error en la manipulación de los reactivos.

La calidad y concentración de los reactivos y la pureza de las muestras de ADN son un requisito indispensable para obtener buenos resultados.

En GSTP1-I105V la frecuencia preliminar del alelo mutante (I/V+V/V) se encuentra entre el 48 y 72% de la población estudiada y es similar a las frecuencias encontradas en otras poblaciones como la Noruega, Euro-americana, Afro-americana, Alemana Australiana y portuguesa; sin embargo si difiere de poblaciones como la Taiwanesa, Francesa, Japonesa, Inglesa, Caucásica e Italiana.

En GSTP1-A114V la frecuencia preliminar del alelo mutante (A/V + V/V) se encuentra entre el 34 y 52% de la población estudiada y difiere significativamente de las frecuencias encontradas en poblaciones como la Euro-americana, Afro-americana, Francesa, Inglesa, Alemana e Italiana.

Incrementando el tamaño de muestra se podrá confirmar o refutar la distribución del polimorfismo de GSTP1 que se reporta en este estudio.

## **RECOMENDACIONES**

Para mejorar la técnica de identificación del polimorfismo genético de GSTP1 es necesario reducir la concentración de ADN pues lo ideal en la técnica de PCR así como otras técnicas de biología molecular es trabajar con pequeñas cantidades que permitan obtener resultados confiables. La calidad de las muestras de ADN es un requisito fundamental para que la PCR resulte de manera satisfactoria y para ello, los reactivos utilizados para su extracción deben ser de excelente calidad y a las concentraciones recomendadas.

Para encontrar las frecuencias genotípicas de GSTP1 en el Sur Occidente Colombiano es necesario incrementar el tamaño de la muestra de estudio, a 200 muestras o más, para obtener resultados con mayor poder estadístico.

## BIBLIOGRAFIA

ALI-OSMAN F, AKANDE A, Y MAO J. Molecular cloning, characterisation and expression of novel functionally different human glutathione s-transferase-P-1 gene variant. In: Proceedings of the International ISSX Workshop on Glutathione S-transferase, Taylor and Francis, London. (1995); p.1061,3439.

ALLAN J., *et al.* Polymorphism in glutathione S-transferase p1 is associated with susceptibility to chemotherapy-induced leukemia. PNAS. (2001); 98:11592 – 11597. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.191211198>.

AU W; SIERRA H; CAJAS N; y SALAMA S. Inheritance of polymorphic metabolizing genes on environmental disease and quality of life. Recent Results Cancer Res. (16 Jul-1999); 428 (1-2):131-40.

AU W. Et al. Memorias Curso Epidemiología Molecular, Susceptibilidad, Genética y Cáncer; (17 – 21 de abril de 2001). Universidad del Cauca. Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética. Popayán.

BIOLABS – NEW ENGLAND. Laboratorio proveedor de productos de investigación a la sociedad científica. Beverly (USA). (citado el 6 de febrero de 2003). Disponible en: <http://www.neb.com>.

BOARD P, WEBB G Y COGGAN M. Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14. Ann. Hum. Genet. (1989);53:205-213.

BOARD P, *et al.* Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. Pharmac. Ther. (1990);48:357-369.

BOTH J, BOYLAND E, SIMS P. An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. Biochem J (1961); 79:516-524.

BOYLAND E Y CHASSEAUD L. The role of glutathione and glutathione s-transferase in mercapturic acid biosynthesis. In: Advances in Enzymology and related areas of molecular biology. (1969); 32:173-229.

CARMICHAEL P; STONE E; GROVE P; GUSTERSON B; and PHILLIPS D. Metabolic activation and DNA binding of food mutagens and others environmental

carcinogens in human mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* (Lond.). (1996): 17:1769-1772.

COOMBES B, STAKELUM GS. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein with glutathione. *J Clin Invest* (1961); 40:981-988.

COYNE Vernon E. *et al* PCR primer design and reaction optimisation. *Molecular Biology Techniques Manual*. Third Edition. Ed [Rybicki](#), Department of [Molecular and Cell Biology](#), University of Cape Town, copyright. (2001).

DAVIDSON COLLEGE. Restriction fragment length polymorphisms. Department of Biology. (Nov. 2001). Available from: <http://www.bio.davidson.edu>.

DE ROOS, A. *et al*. Genetic polymorphisms in GSTM1, -P1, -T1, and CYP2E1 and the risk of adult brain tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* (Jan 2003): 12 (1): 14 – 22.

GARCÍA, H.M. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo Diagnóstico*. (2000); 1(2): 31-4.

GRIFFITHS A., *et al*. *An Introduction to Genetic Analysis*. Freeman and Company. 7<sup>a</sup> Edition. (2000).

GUDMUNSDOTTIR K; TRYGGVADOTTIR L; and EYFJORD J. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Genotypes in Relation to Breast Cancer Risk and Frequency of Mutations in the p53 Gene. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. (Nov. 2001); 10: 1169-1173.

GROVER P; MACNICOLL A; SIMS P; EASTY G; and NEVILLE A. Polycyclic hydrocarbon activation and metabolism in epithelial cell aggregates prepared from human mammary tissue. *Int. J. Cancer*.(1980): 26:467-475.

HAYES J Y STRANGE R. Potential contribution of the glutathione s-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Rad res* (1995);22:193-207.

HAYES J Y PULFORD D. The glutathione s-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* (1995);30:445-600.

HAYES J Y MCLELLAN L. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Rad Res* (1999);31:273-300.

HAYES J. Y STRANGE R. .Glutathione s-transferase polimorfism and their biological consequences. *Pharmacology*. (2000); 61:154-166.

HARRIES L. W.,*et al*. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione s-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer, carcinogenesis. (1996); 18: 641-644.

HARRIS M, *et al*. Polimorphism of the pi class glutathione S-transferase in normal populations and cancer patients. *Pharmacogenetics* (1998);8:27-31.

HOYOS, L. *et al*. Evaluación del efecto genotóxico y citotóxico de las drogas psicoactivas en el departamento del Cauca. Universidad del Cauca (2003).

HUSGAFVEL-PURSIAINEM K. Molecular Biomarkers in Studies on Environmental Cancer. *J. Epidemiol. Community Health*. (Oct. 2002);56:730-731.

Human Gene Nomenclature database, HUGO. Weizman Institute of Science. GSTP1 (Glutathione S-transferase pi), (Oct. 2002). Available from: <http://www.genecard.org>. bcgsc.

INGELMAN-SUNDBLERG M. Genetic Variability in Susceptibility and response to Toxicants. *Toxicol. Lett*. (31 Mar. 2001);120: 259-68.

JAKOBSSON P, MORGENSTERN R Y SAMUELSSON B. Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999);96:7220-7225.

JAKOBSSON P, *et al*. Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci* (1999);8:689-692.

JANICE S. Dorman on behalf of the International Molecular Epidemiology Task Force. Department of Epidemiology, Graduate School of Public Health. University of Pittsburgh, PA 15261.(2002) Disponible en: <http://www.pitt.edu/~kkr/task.html>.

JERÓNIMO C; VARZIM G; HENRIQUE R; OLIVEIRA J; BENTO M; SILVA C; LOPES C; and SIDRANSKY D. I105V Polymorphism and Promoter Methylation of the GSTP1 Gene in Prostate Adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev*.(May. 2002); 11: 445 - 450.

JOANNE E. CURRAN; WIENSTEIN R; and GRIFFITHS L. Polymorphism of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility. *Cancer Letters*. (2000); 153: 113-120.

JURENKOVA N; VOHO A; BOUCHARDY C; WILKMAN H; DAYER P; BENHAMOU S; and HIRVONEN A. Glutathione S-Transferase GSTM3 and GSTP1 Genotypes and Larynx Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.*(Feb. 1999); 8: 185-188.

KATOH T, *et al.* Human glutathione s-transferase P1 polymorphism and susceptibility to smoking related epithelial cancer; oral, lung, gastric, colorectal and urothelial cancer. *Pharmacogenetics* (1999); 9:165-169.

KLUG, W & CUMMINGS, M. *Conceptos de Genética*. Quinta edición. Prentice Hall.(1999). pag. 307-308.

KRISTENSEN, V; ANDERSEN, T; ERIKSTEIN B; GEITVIK, G; SKOVLUND, E; NESLAND, J and BORRESEN, A. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics* (1998); 8:441-447.

[LA DU B.N.](#) Is paraoxonase-3 another hdl-associated protein protective against atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (Apr. 2001);21(4):467-8.

LÁÑEZ P.E. *Biología y Sociedad*. Introducción a la Biología. Universidad de Granada, España. Última actualización 21 de enero de 2003. Disponible en: <[Http://www.ugr.es/~eianez/Biologia.htm](http://www.ugr.es/~eianez/Biologia.htm)>.

LONGUEMAUX S., *et al.* Candidate Genetic Modifiers of individual Susceptibility to Renal Cell carcinoma: A study of Polymorphic Human Xenobiotic-metabolizing Enzymes. *Cancer Research.* (1999); 59:2903-2908.

LEE, W. H., *et al.* CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: A new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*(1997); 6: 443 - 450.

MADIGAN, Michael; MARTINKO, J y PARKER, J. *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall.(1999); pag. 188-190.

MENEGON A, BOARD P, BLACKBURN A, MELLICK G Y LE COUTEUR D. *Lancet* (1998);352:1344-1346.

MILLER S.A., DYKES D.D., and POLESKY. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research.* (1988), 16: 1215 – 1215.

MITRUMEN K, JOURENKOVA N, KATAJA V, ESKELINEN M, KOSMA V, BENHAMOU, VAINIO H, UUSITUPA M and HIRVONEN A. Glutathione S-Transferase M1, M3, P1 and T1 Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. (March 2001); 10: 229-236.

MOSCOW J, *et al.* Isolation of the human anionic glutathione transferase cDNA and relation of its gene expression to estrogen-receptor content in primary breast cancer. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* (1988);85:6518-6522.

MURUMATSU M., *et al.* Glutathione s-transferase  $\pi$  as a determinant of drug resistance in transfectant cell lines. *J. Biol. Chem.* (1990); 265:4296-22301.

NAKAGAWA K., *et al.* Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype Analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics*, (1998). 8:441 – 447.

NORPA H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ Health Perspect.* (Jun 1997); 105 Suppl 4: 829-35.

PARK, J, *et al.* Association between glutathione S-transferase pi genetic polymorphism and oral cancer risk. *Pharmacogenetics* (Jun 2000); 10(4):371.

PEÑA, Carlos; CARTER, Dean & FIERRO, Felix. TOXICOLOGÍA AMBIENTAL: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. The University of Arizona. (Junio 7 de 2001). Disponible en: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c1-1-1-4.html>.

PERERA FP. Molecular Epidemiology and Carcinogen-DNA adduct detection: new approaches to studies of human cancer causation. *J. Chronic Dis.* (1982); 35(7): 581-600.

\_\_\_\_\_. Environmental and cáncer: who are susceptible?. *Science.* (7 Nov.1997); 278 (5340): 1068-73.

PERERA FP. Molecular Epidemiology of environmental carcinogenesis. *Recent Results Cancer Res.* (1998); 154:39-46.

\_\_\_\_\_. Molecular Epidemiology: On the Path to Prevention? *J. Natl. Cancer Inst.* (Apr. 2002); 92(8): 602-612.

PIIPARI [R, et al.](#) Glutathione S-transferases and aromatic DNA adducts in smokers' bronchoalveolar macrophages. *Lung Cancer*. (Mar. 2003);39(3):265-72.

PUCHALSKI, R. B. AND FAHL, W. E. Expression of recombinant glutathione s-transferase  $\pi$ , Ya or Yb1 confers resistance to alkylating agents. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* (1990); 87:2443-2447.

[RONIS MJ, HUANG J, LONGO V, TINDBERG N, INGELMAN-SUNDBERG M, BADGER TM.](#) Expression and distribution of cytochrome P450 enzymes in male rat kidney: effects of ethanol, acetone and dietary conditions. *Biochem Pharmacol.* (Jan 15, 1998);55(2):123-9.

RYBERG, D.; SKAUG, V; and HEWER, A. Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk, *Carcinogenesis*. (1997); 18:1285-1289.

SPURDLE A; WEBB P; PURDIE D; CHEN X; GREEN A; and CHENEVIX G. Polymorphisms at the glutathione S-transferase GSTM1, GSTT1 and GSTP1 loci: risk of ovarian cancer by histological subtype. *Carcinogenesis*. (2001); 22 no. 1: 67-72.

STANULLA, M. *et al.* Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood*. (Feb. 2000);95(4):1222-8.

STRANGE R, JONES P Y FRYER A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters* (2000);112-113:357-363.

TAN W., *et al.* Impact of Genetic Polymorphism 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*.(2000);9:551-556.

[TASHIRO K, et al.](#) Glutathione-S-transferase-pi expression regulates sensitivity to glutathione-doxorubicin conjugate. *Anticancer Drugs*. (Sep. 2001);12(8):707-12.

TERRIER P, *et al.* An immunohistochemical study of pi class glutathione S-transferase expression in normal tissue. *Am J Pathol* (1990);137:845-853.

TO-FIGUERAS, J. *et al.* Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 gene and lung cancer risk. *Cancer Causes Control*. (Febrero 1999): 10(1): 65-70.

TOZZI G., *et al.* Antioxidant enzymes in blood of patients with Friedreich`s ataxia. *Arch Dis Child* (2002); 86:376-380.

VESSELA K; ANDERSEN, T; ERIKSTEIN B; GEITVIK, G; SKOVLUND, E; NESLAND, J and BORRESEN, A. Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics* (1998); 8:441-447.

WATSON, M. *et al.* Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*. (Feb. 1998):19(2):275-280.

WELFARE M., *et al.* Polymorphisms in GSTP1, GSTM1, and GSTT1 and Susceptibility to Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention*. (1999); 8:289-292.

WHALEN R Y BOYER TD. Human glutathione s-transferases. *Seim Liver Dis* (1998);18:345-358.

WILLIAMS A and PHILLIPS D. Mammary Expression of Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Their Potential Role in Breast Cancer. *Cancer Res*. (1 Sep. 2000); 60: 4667-4677.

ZHAO M; LEWIS R; GUSTAFSON D; WEN W; CERHAN J; and ZHENG W. No Apparent Association of GSTP1 A<sup>313</sup>G Polymorphism with Breast Cancer Risk among Postmenopausal Iowa Women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*(Dec. 2001); 10: 1301-1302.

## BIBLIOGRAFÍA COMPLEMENTARIA

CAMBRIDGE INTERNATIONAL DICTIONARY of ENGLISH. Cambridge – United Kindom.(2000). ISBN: 0-521-48236-4.

GOMEZ, R. P. Ciencia, Tecnología y Sociedad. Cienciateca. Enero 15 de 2003. Disponible en internet: <http://www.cienciateca.com>.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN (ICONTEC). Compendio de Normas Técnicas Colombianas sobre Documentación. Presentación y elaboración de Tesis de Grado y trabajos Científicos, Hoja de Vida. Santa Fé de Bogotá. Editado por: ICONTEC. (2003).

LENDER T; DELAVAUULT R; y LE MOIGNE A. Diccionario de Biología. Barcelona – España. Ediciones Grijalbo. (1982). ISBN: 84-253 1372-4.

LIBRARY of the Sciences and Medicine, HighWire. Leland Standford Junior University. (2001 – 2003). Abailable from Internet: <http://www.highwire.org>.

MALPICA, K. Las drogas tal cual.... Estadísticas de consumo de México, España y a nivel Mundial (On line). (Actualizado en 20 de febrero de 2003). Disponible en: <[Http://www.mind-surf.net/drogas/estadísticas.html](http://www.mind-surf.net/drogas/estadísticas.html).

MARTINEZ C. Estadística y Muestreo. Décima Edición. Santa Fé de Bogotá. Eco Ediciones. (2000). ISBN: 958-648-244-8.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Database (On line). Update 1 may 2003. Available from: <http://www.ncbi.com>.

TEW K.D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. Perspectives in cancer research. Cancer Res. (1994); 48:3622.

TOXICOLOGÍA AMBIENTAL. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. The University of Arizona. (Junio 7 de 2001). Disponible en: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c1-1-1-4.html>.