



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL

**“ASOCIACION DE POLIMORFISMOS EN GENES *CYP450*, *EPXH1* Y
GSTM1 CON LOS NIVELES URINARIOS DE 1-HIDROXIPIRENO EN
INDIGENAS TEPEHUANOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

CLAUDIA EDITH BAILON SOTO

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

Dra. Norma Paniagua Castro

Victoria de Durango, Dgo., Junio de 2015



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL

**“ASOCIACION DE POLIMORFISMOS EN GENES *CYP450*, *EPXH1* Y
GSTM1 CON LOS NIVELES URINARIOS DE 1-HIDROXIPIRENO EN
INDIGENAS TEPEHUANOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN
BIOTECNOLOGIA

PRESENTA

CLAUDIA EDITH BAILON SOTO

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

Dra. Norma Paniagua Castro

Victoria de Durango, Dgo., Junio de 2015



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 16:00 horas del día 17 del mes de Diciembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Asociación de polimorfismos en genes CYP450, EPHX1 y GSTM1 con los niveles urinarios de 1-hidroxipireno en indígenas tepehuanos

Presentada por el alumno:

BAILÓN

SOTO

CLAUDIA EDITH

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	1	7	9
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías

Dra. Norma Paniagua Castro

Dr. Carlos Galaviz Hernández

Dr. José Ismael Antonio Lares Asef

Dr. Isaías Chairez Hernández

Dra. Martha Rosales Castro

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. José Antonio Avila Reyes



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



SEP-13-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 16 de Diciembre del 2014

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión Extraordinaria No. 5 celebrada el día 03 del mes de junio conoció la solicitud presentada por el(ia) alumno(a):

BAILÓN

SOTO

CLAUDIA EDITH

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre (s)

Con registro:

A	1	0	0	1	7	9
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Asociación de polimorfismos en genes CYP450, EPHX1 y GSTM1 con los niveles urinarios de 1-hidroxipireno en indígenas tepehuanos

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías y la Dra. Norma Paniagua Castro

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:
El CIIDIR-IPN Unidad Durango
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías
Aspirante

M. en C. Claudia Edith Bailón Soto

Dra. Norma Paniagua Castro
Presidente del Colegio

Dr. José Antonio Avila Reyes
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
C.I.I.D.I.R
INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En Durango, Dgo., el día **03** del mes de **junio** del año **2014**, la que suscribe **Claudia Edith Bailón Soto** alumna del Programa de **Doctorado en Ciencias en Biotecnología**, con número de registro **A100179**, adscrita al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango**, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Martha Guadalupe Sosa Macías** y de las **Dra. Norma Paniagua Castro**, y cede los derechos del trabajo titulado **Asociación de los polimorfismos de CYP450, EPHX1 y GSTM1 con los niveles urinarios de 1-hidroxipireno en indígenas Tepehuanos**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones claudbay2004@yahoo.com.mx, sosa.martha@gmail.com y npaniaguag@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Claudia Edith Bailón Soto', is positioned above a horizontal line.

M. C. Claudia Edith Bailón Soto

Lugar de realización de la tesis

Este trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del CIIDIR-DURANGO del IPN, en el Laboratorio de Biología Molecular. La dirección de este trabajo estuvo a cargo de la Dra. Martha Sosa Macías y de la Dra. Norma Paniagua Castro. Se contó con la atinada asesoría del Dr. Carlos Galaviz Hernández, del Dr. Ismael Lares Asseff y del Dr. Isaías Cháirez Hernández.

DEDICATORIA

A mi madre por darme la vida, guiarme y alentarme en cada paso de mi vida con su amor inigualable.

A mi padre por apoyarme y protegerme siempre incondicionalmente.

A mis abuelos por cuidarme y quererme infinitamente.

A mi hermano por su solidaridad y compañía.

A mi hija adorada por ser mi inspiración y mi principal motivo de superación.

A mi mejor amigo y compañero por su amor sin fronteras y su inmensa paciencia.

AGRADECIMIENTOS

A Cristo resucitado por sostenerme y alentarme a lo largo de mi singular estancia doctoral; y a la santísima Virgen María, por su intercesión ante Dios por mis defectos y errores.

A mi madre por su infinito amor y apoyo en las buenas y en las malas; por su bella sonrisa y por haberme enseñado a perseverar.

A mi padre por salvarme y guiarme una y otra vez y cuantas veces ha sido necesario.

A mi hermano por su apoyo, chispa y sentido del humor.

A mi hija por su inigualable amor, su compañía y su maravillosa presencia.

A Miguel por su apoyo y amistad desinteresada, y más aún por su amor incalculable, su paciencia y su tierna espera.

A mi mejor amiga y comadre Claudia por su gran amistad y nuestra historia juntas. Y a mis queridas amigas Jazmín y Silvia por su amistad y su apoyo en este camino doctoral.

A la Dra. Martha Sosa Macías, mi directora de tesis, quién creyó en mí y me dio su voto de confianza para trabajar con su enriquecedor proyecto de indígenas tepehuanos y formar parte de su gran equipo de trabajo. Agradezco especialmente todo su apoyo, su dedicación y su infinita paciencia a lo largo de mi estancia doctoral.

A la Dra. Norma Paniagua Castro, mi codirectora de tesis que me brindó su voto de confianza y todo su apoyo a lo largo de mi camino doctoral.

Al Dr. Carlos Galaviz Hernández, por haber creído en mí y permitirme crecer con los retos intelectuales y experimentales. Gracias por todo el apoyo, las correcciones, las observaciones, las pláticas y sobre todo, por la confianza para trabajar en ese gran recinto que es el Laboratorio de Biología Molecular del CIIDIR.

A Gaby y a Azalia por su amistad, compañía y anécdotas del CIIDIR, así como a las amigas y amigos de clases, laboratorio y salidas a congresos. Gracias por la grata convivencia y el tiempo compartido.

A mi querida Cati, a Juanita, Tere y Tania por su apoyo, su asesoría y su grata compañía en mi estancia en San Luis Potosí.

Al Dr. Iván Nelinho Pérez Maldonado por asesorarme atinadamente y prestarme su laboratorio de Toxicología Molecular en el CIAAS de San Luis Potosí.

Al Dr. Fernando Díaz Barriga por facilitarme el uso del equipo de HPLC del departamento de Toxicología Ambiental del CIAAS de San Luis Potosí.

Al Dr. José Salas Pacheco por asesorarme y permitirme trabajar en su laboratorio del Instituto de Investigación de la UJED.

Al Dr. Isaías Cháirez Hernández por sus enseñanzas, su paciencia y su guía en mi arduo camino estadístico. ¡Gracias por ayudarme a entender mejor la estadística y a apreciar sus bondades!

Al Dr. Natividad Gurrola por su apoyo a lo largo de mi estancia doctoral, tanto en los momentos difíciles como en los gratos.

Al Dr. Ismael Lares Asseff por su asesoría, por la compartición de su experiencia y su apoyo.

A la Dra. Martha Rosales Castro por sus aportaciones en la revisión del presente documento; por su comprensión y gran apoyo.

A la Maestra Noelia Rivera Quintero, porque en vida fue un ejemplo a seguir y fue un gran pilar y refugio para mí como estudiante de posgrado. Fue una guía comprensiva, empática, asertiva, inteligente y cálida.

A la Maestra Mayra Burciaga Siqueiros por ser una profesional en los asuntos educativos, por su calidez, por su gran apoyo, y su acompañamiento en mi singular trayectoria escolar en el CIIDIR.

Al Dr. José Antonio Ávila Reyes por su apoyo, su confianza en mí como estudiante y por brindarme, desde su digno cargo, todas las facilidades para que pudiese concluir de manera satisfactoria mi estancia escolar.

Agradezco al noble y prestigiado Instituto Politécnico Nacional por haberme permitido formar parte de él a través del CIIDIR-Durango. Así como al honorable Colegio de Profesores del CIIDIR, por permitirme avanzar en mi trayectoria estudiantil.

Finalmente, deseo agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por la beca otorgada a mi persona y por el apoyo recibido del proyecto (2011-C01-162368).

Claudia Edith Bailón Soto

ÍNDICE

GLOSARIO	I	
SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	IV	
ÍNDICE DE FIGURAS	V	
ÍNDICE DE CUADROS	VII	
RESUMEN	IX	
ABSTRACT	X	
I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	2
II.1.	Población indígena de México	2
II.1.1.	Tepehuanos del Sur	2
II.2.	Contaminantes presentes en el humo de la quema de biomasa y basura	5
II.2.1.	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	5
II.2.2.	Estructura química y propiedades físicas del HAP pireno	6
II.2.3.	Fuentes de exposición a HAPs	6
II.2.4.	Susceptibilidad pulmonar por exposición a HAPs	7
II.2.5.	Susceptibilidad cardiovascular por exposición a HAPS	7
II.3.	Metabolismo de los HAPs	8
II.3.1.	Enzima CYP1A1	9
II.3.2.	Enzima CYP2D6	11
II.3.3.	Enzima CYP3A4	12
II.3.4.	Enzima Epóxido hidrolasa	13

II.3.4.1.	Epóxido hidrolasa microsomal	13
II.3.5.	Familia enzimática de las Glutación S-Transferasas (GSTs)	14
II.3.5.1.	Glutación S-Transferasa clase Mu	15
III	JUSTIFICACIÓN	16
IV	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
V	HIPÓTESIS	16
VI	OBJETIVOS	16
VI.1.	Objetivo general	16
VI.2.	Objetivos específicos	17
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	17
VII.1.	Diseño Experimental	17
VII.2.	Población de estudio	17
VII.2.1.	Tamaño de muestra	17
VII.3.	Criterios del estudio	17
VII.3.1.	Criterios de inclusión	17
VII.3.2.	Criterios de exclusión	18
VII.3.3.	Criterios de eliminación	18
VII.4.	Variables del estudio	18
VII.4.0.	Tipos de variables	18
VII.4.1.	Variable dependiente	18
VII.4.2.	Variables independientes	18
VII.4.3.	Variables intervinientes	18
VII.5.	Consideraciones éticas	21

VII.6.	Métodos	21
VII.6.1.	Extracción de ADN	21
VII.6.2.	Determinación de la calidad y pureza del ADN	22
VII.6.3.	Genotipificación	22
VII.6.4.	Obtención, manejo y almacenamiento de la orina	22
VII.6.5.	Determinación de los niveles urinarios de 1-hidroxipireno (1-OHP)	22
VII.7.	Análisis estadístico.	23
VIII	RESULTADOS	26
VIII.1.	Características de la población.	26
VIII.2.	Frecuencias alélicas y genotípicas.	29
VIII.2.1.	Equilibrio Hardy-Weinberg.	32
VIII.2.2.	Desequilibrio de ligamiento.	33
VIII.3.	Evaluación de los niveles urinarios de 1-hidroxipireno (1-OHP).	34
VIII.4.	Análisis de asociación entre variables antropométricas, bioquímicas y genéticas con los niveles urinarios de 1-OHP.	38
VIII.4.1.	Prueba de la Chi cuadrada (X^2).	38
VIII.4.1.1.	Coeficientes PHI de Pearson V de Cramer.	38
VIII.4.2.	Correlación de Spearman.	39
VIII.5.	Análisis multivariado entre variables antropométricas, bioquímicas y genéticas con los niveles urinarios de 1-OHP en indígenas tepehuanos de Durango.	40
VIII.5.1.	Análisis de correlación canónica.	40

VIII.5.2.	Análisis de correlación canónica no lineal (OVERALS).	46
VIII.5.3.	Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA).	49
VIII.5.4.	Análisis de componentes principales categóricos (CATPCA).	61
VIII.5.5.	Análisis de agrupamiento jerárquico (Hierarchical Cluster Analysis).	66
VIII.6.	Redes neuronales (Neural Networks).	70
VIII.7.	Regresión logística (Logistic Regression).	74
IX	DISCUSIÓN	75
X	PERSPECTIVAS	80
XI	BIBLIOGRAFÍA	81
XII	ANEXOS	103
XII.1	Discriminación alélica para <i>CYP1A1*2C</i> por tiempo real.	104
XII.1.1.	Discriminación alélica para <i>CYP1A1*4</i> por tiempo real.	105
XII.2.	Discriminación alélica para <i>EPXH1 HYL*2</i> por tiempo real.	106
XII.2.1.	Discriminación alélica para <i>EPXH1 HYL*3</i> por tiempo real.	108
XII.3.	Detección de la presencia/ausencia de <i>GSTM1</i> por PCR multiplex.	110
XII.4.	Artículo publicado.	110

GLOSARIO

ALELO: Es la forma alternativa de un gen.

ALELO NULO: Es un alelo que da lugar a la ausencia de producto génico, o a un producto sin actividad. Una delección del gen es necesariamente un alelo nulo.

BIOMASA: Es un amplio conjunto de materias orgánicas que se caracteriza por su heterogeneidad, tanto por su origen como por su naturaleza.

CODOMINANTE: Alelo que contribuye por igual al fenotipo cuando se expresa en un heterocigoto.

CONTROL NEGATIVO: También conocido como NTC, no template control, por sus siglas en inglés. En el equipo de PCR en tiempo real, StepOne, es necesaria la inclusión de un ensayo con solución amortiguadora y agua en vez de muestra, además de los otros ingredientes de reacción. Este control negativo no debe presentar amplificación.

Ct: también llamado ciclo umbral. Se calcula durante la fase exponencial de la reacción de PCR en tiempo real. El Ct es inversamente proporcional al número de copias del templado blanco (target); es decir que a mayor concentración de templado, menor Ct medido.

CORRECCIÓN DE BONFERRONI: Es un procedimiento estadístico de verificación de hipótesis que se emplea para reducir el error tipo I (rechazo de una hipótesis nula verdadera) cuando se realizan pruebas múltiples o comparaciones/contrastes de medias planificados a priori.

DERIVA GENÉTICA: Fluctuaciones en las frecuencias génicas que se producen al azar y son más evidentes en poblaciones aisladas y pequeñas.

DIPLOIDE: Célula u organismo con dos complementos cromosómicos, de forma que posee un número total de cromosomas que es doble del haploide. Se representa por 2N.

DISTANCIA GENÉTICA: Se refiere a la divergencia genética entre especies o entre poblaciones de una misma especie, la cual se mide con una variedad de parámetros estadísticos.

DIVERSIDAD GENÉTICA (HETEROCIGOCIDAD ESPERADA): Es una medida de la variación genética en una población.

ELECTROFORESIS: Es una técnica en la que se utiliza una corriente eléctrica controlada con la finalidad de separar macromoléculas (ADN o proteínas) según su tamaño y carga eléctrica a través de una matriz gelatinosa.

ESQUISTO: Conjunto de arcillas ricas en compuestos orgánicos e inorgánicos que se acumulan en lechos acuáticos debido a la descomposición de fósiles. El esquisto bituminoso es rico en petróleo y se usa como combustible.

EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG: Establece que la composición genética de una población permanece en equilibrio mientras no actúe alguna fuerza evolutiva como selección, migración, mutación y deriva genética. Las frecuencias alélicas y las genotípicas permanecerán constantes de generación en generación, pudiendo predecir los valores para las futuras generaciones.

FLUJO GENÉTICO: Se refiere al flujo o desplazamiento de genes de una población a otra que las hace similares entre sí.

GENOTIPO: Constitución genética de un individuo, sea en su totalidad o en un locus específico.

HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAPs): Son compuestos químicos formados por dos o más anillos bencénicos fusionados entre sí. Los HAPs son el resultado de la combustión total o parcial del carbón, madera, gases, grasas y residuos domésticos. De manera natural están presentes en restos de fósiles como el alquitrán, el carbón y el petróleo.

LOCUS: Localización exacta de un gen en un cromosoma.

NUCLEÓTIDOS: Son los bloques básicos del ADN y del ARN. Los nucleótidos del ADN están formados por una base nitrogenada, el azúcar desoxirribosa (ribosa para el ARN) y un grupo fosfato.

1-HIDROXIPIRENO (1-OHP): Metabolito monohidroxilado del pireno que puede ser cuantificado en orina. Sirve como biomarcador de exposición a HAPs.

PIRENO: Hidrocarburo aromático policíclico formado de cuatro anillos bencénicos que a temperatura ambiente es un sólido incoloro o de un amarillo pálido.

POLIMORFISMO: Se refiere a la variación en la secuencia de un punto específico del ADN presente en los individuos de una determinada población. Para ser llamado como tal, esta variación debe presentarse en el 1% de la población por lo menos.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR): Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés, es una técnica usada para crear un gran

número de copias de un segmento de ADN, que utiliza ciclos de desnaturalización, apareamiento con cebadores y extensión por una ADN polimerasa termoresistente.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR):

Esta metodología se basa en el diseño de sondas específicas para un segmento de ADN (alelo), las cuales son marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, de tal manera que es posible discriminar un alelo de otro por el tipo de fluorescencia.

REACTIVOS TAQMAN[®]: sirven para medir la producción y rendimiento de los productos de PCR mediante un sistema de sondas marcadas con dos fluorocromos. Uno de estos fluoróforos se encuentra en el extremo 3' y el otro en el extremo 5'. Entre ambos extremos una molécula específica bloquea su emisión de fluorescencia, quencher por sus siglas en inglés. Esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte comprendida entre ambos extremos del producto de PCR a obtener.

REDES NEURONALES: Es una herramienta de modelación eficiente, simple y potente, para reconocer patrones basada en la arquitectura biológica de las neuronas cerebrales.

SNP: Single nucleotide polymorphism, por sus siglas en inglés, es una variación de un sólo nucleótido entre genomas de individuos de la misma especie.

SUSTITUCIÓN SILENCIOSA: Los SNP que se localizan dentro de una secuencia codificante que no modifican la cadena de aminoácidos que producen. También se conoce como una sustitución sinónima.

TEMPLADO: Hebra de ADN dúplex que actúa como molde para la transcripción.

TEPEHUANOS: Nombre de la etnia amerindia que habita el norte de México en los estados de Durango, Nayarit y Zacatecas (Tepehuanos del Sur) y Chihuahua (Tepehuanos del Norte).

XENOBIÓTICOS: Se les llama así a todos aquellos compuestos químicos ajenos al metabolismo natural del organismo humano, que están presentes en el medio ambiente.

SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
B[α]P	Benzoalfapireno
cm	Centímetro
Ct	Ciclo umbral (threshold cycle)
°C	Grado Celsius
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F	Estadístico F de Fisher
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
H	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de Alta resolución
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IC	Intervalo de confianza
IMC	Índice de masa corporal
Kb	Kilobase
Kg	Kilogramo
λ	Longitud de onda
Δ	Estadístico Lambda de Wilks
L	Litro
MgCl	Cloruro de magnesio
μ l	Microlitro
μ M	Micrómetro
M	Metro
m^2	Metro cuadrado
μ g/g	Microgramo por gramo
μ mol/mol	Micromol por mol
mg/dL	Miligramo por decilitro
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
Min	Minuto
mol/L	Mol por litro
ng/g	Nanogramo por gramo
Nm	Nanómetro
nmol/L	Nanomol por litro
OR	Odd ratio (razón de momios)
Pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
R	Correlación canónica
Rpm	Revoluciones por minuto
S	Segundo
U/L	Unidades por litro
1-OHP	1-hidroxipireno
χ^2	Chi-cuadrada

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de los HAPs	6
Figura 2	Metabolismo de Fase I y II del B[α]P	9
Figura 3	Esquema del gen <i>CYP1A1</i>	10
Figura 4	Esquema del gen <i>CYP2D6</i>	11
Figura 5	Esquema del gen <i>CYP3A4</i>	12
Figura 6	Esquema del gen <i>EPHX1</i>	13
Figura 7	Esquema de los genes <i>GSTM</i>	15
Figura 8	Distribución de <i>EPXH1 HYL*2</i> en mujeres y hombres tepehuanos.	39
Figura 9	Raíces o variables canónicas obtenidas a partir de las variables analizadas en indígenas tepehuanos de Durango.	43
Figura 10	Tendencia de los conjuntos de variables que conforman la primera correlación canónica.	43
Figura 11	Puntuaciones y saturaciones de las variables en indígenas tepehuanos por dimensión.	47
Figura 12	Análisis y agrupamiento por cuantificación de los centroides de los rangos de las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas entre hombres y mujeres tepehuanos.	48
Figura 13	Gráfico de sedimentación de los valores únicos o eigenvalues por componente del análisis de variables en indígenas tepehuanos.	51
Figura 14	Proyección de los casos de acuerdo al género en dos componentes principales (F1 y F2).	53
Figura 15	Proyección de las variables activas y suplementarias analizadas en dos dimensiones (coordenadas principales).	54
Figura 16	Agrupamiento de las variables analizadas en tres componentes principales después de la rotación de los ejes.	55
Figura 17	Reubicación de las variables después de la rotación varimax normalizada.	56
Figura 18	Gráfico de sedimentación de los 10 componentes después de la rotación varimax.	57
Figura 19	Contraste de las variables bioquímicas y genéticas en indígenas tepehuanos evaluados con 1-OHP.	59
Figura 20	Gráfico de comparación y contraste de las variables bioquímicas y genéticas analizadas por PCA en indígenas tepehuanos con 1-OHP.	60
Figura 21	Distribución bidimensional de los puntos de los objetos etiquetados por el número de cada caso (indígena tepehuano evaluado).	62
Figura 22	Cargas de los componentes de las variables evaluadas en indígenas tepehuanos.	63
Figura 23	Representación biespacial de variables y casos asociados a ellas a partir de datos de indígenas tepehuanos.	64

Figura 24	Dendograma jerárquico de similitud entre indígenas tepehuanos. Resultados de la técnica de conglomerados por el método de Ward.	66
Figura 25	Dendograma de similitud de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas evaluadas en indígenas tepehuanos por el método de Ward.	68
Figura 26	Representación de la red neuronal empleada para analizar las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de indígenas tepehuanos con sus niveles urinarios de 1-OHP.	70
Figura 27	Histograma de la red neuronal escogida.	72
Figura 28	Modelo logístico multivariado y sus variables.	73
Figura 29	Superficie de discriminación alélica para <i>CYP1A1*2C</i>	104
Figura 30	Curvas de amplificación para <i>CYP1A1*2C</i>	104
Figura 31	Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica de <i>CYP1A1*2C</i>	105
Figura 32	Superficie de discriminación alélica para <i>CYP1A1*4</i>	105
Figura 33	Superficie de discriminación alélica para <i>EPXH1 HYL*2</i>	106
Figura 34	Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica del homocigoto (T/T) de <i>EXPH1 HYL*2</i>	106
Figura 35	Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica del heterocigoto (T/C) de <i>EXPH1 HYL*2</i>	107
Figura 36	Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica del homocigoto (C/C) de <i>EXPH1 HYL*2</i>	107
Figura 37	Superficie de discriminación alélica para <i>EPXH1 HYL*3</i>	108
Figura 38	Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de <i>GSTM1</i> y del gen β -actina.	109

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Principales causas de morbilidad general en el Municipio del Mezquital, Durango, 2013.	4
Cuadro 2	Iniciadores de PCR para la amplificación del gen <i>GSTM1</i> .	21
Cuadro 3	Parámetros de validación del método de HPLC para la determinación de 1-OHP urinario.	22
Cuadro 4	Descripción de las características antropométricas y bioquímicas de la población Tepehuana.	27
Cuadro 5	Comparación de las características antropométricas y bioquímicas entre mujeres y hombres tepehuanos (t de Student).	28
Cuadro 6	Frecuencias alélicas de polimorfismos en <i>CYP1A1</i> , <i>CYP2D6</i> , <i>EPXH1</i> y <i>GSTM1</i> en 120 individuos Tepehuanos.	29
Cuadro 7	Frecuencias genotípicas de polimorfismos en <i>CYP2D6</i> , <i>CYP1A1</i> , <i>EPXH1</i> y <i>GSTM1</i> en 120 sujetos Tepehuanos.	31
Cuadro 8	Distribución alélica de <i>CYP1A1*2C</i> en indígenas tepehuanos por sexo.	32
Cuadro 9	Distribución alélica de <i>EPXH1 HYL*2</i> en indígenas tepehuanos por sexo.	33
Cuadro 10	Distribución genotípica de <i>EPXH1 HYL*2</i> en indígenas tepehuanos por sexo.	33
Cuadro 11	Niveles urinarios de 1-OHP en Tepehuanos en $\mu\text{mol/mol}$ creatinina y ng/g creatinina	34
Cuadro 12	Niveles urinarios de 1-OHP de indígenas tepehuanos expuestos al humo de la quema de biomasa.	35
Cuadro 13	Hidroxipireno urinario (corregido por creatinina). Media geométrica y percentiles seleccionados de las concentraciones de orina (ng/g de creatinina) para la población Tepehuana por género del presente estudio.	35
Cuadro 14	Correspondencia entre <i>CYP1A1*2C</i> , <i>CYP2D6*2A</i> , <i>CYP3A4*1B</i> , <i>EPXH1 *HYL2</i> y <i>GSTM1 -/-</i> con niveles urinarios de 1-OHP ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) en indígenas tepehuanos de Durango.	36
Cuadro 15	Correlaciones no paramétricas significativas entre variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de indígenas tepehuanos.	40
Cuadro 16	Resumen del análisis de correlación canónica en indígenas tepehuanos de Durango.	41
Cuadro 17	Correlaciones entre conjuntos de variables para el análisis de correlación canónica en indígenas tepehuanos de Durango.	42
Cuadro 18	Pesos canónicos para el conjunto derecho de variables de indígenas tepehuanos de Durango.	43

Cuadro 19	Pesos canónicos para el conjunto izquierdo de variables de indígenas tepehuanos de Durango.	44
Cuadro 20	Evaluación de las raíces canónicas con la X^2 de datos de indígenas tepehuanos de Durango.	44
Cuadro 21	Matriz de correlación entre variables evaluadas en indígenas tepehuanos de Durango.	49
Cuadro 22	Comunalidades de las variables analizadas en tepehuanos.	50
Cuadro 23	Varianza total explicada por componente principal.	51
Cuadro 24	Representación de las cargas de los 4 componentes analizados.	52
Cuadro 25	Resultados del método de rotación varimax con normalización de Kaiser.	52
Cuadro 26	Comunalidades de los factores después de la rotación.	56
Cuadro 27	Valores únicos después de la rotación.	57
Cuadro 28	Correlaciones de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas para análisis CATPCA.	61
Cuadro 29	ANOVA procedente del análisis de K medias en indígenas tepehuanos.	69

RESUMEN

Los Tepehuanos del sur son indígenas de Durango expuestos al humo de leña y biomasa formado por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Éstos son algunos causantes de la contaminación ambiental del aire, un problema de salud pública en México. Los HAPs son muy reactivos debido a su biotransformación enzimática; destaca el pireno, cuantificable en orina cuya forma monohidroxilada 1-OHP se usa como biomarcador indirecto de exposición a HAPs. En este trabajo se determinó la asociación de polimorfismos genéticos de *CYP450*, *EPXH1* y *GSTM1* con 1-OHP urinario en indígenas Tepehuanos del sur. Se estudiaron 120 voluntarios aparentemente sanos. Se determinaron los polimorfismos *CYP1A1**2C, *4, *CYP2D6**2, *3, *4, *5, *6, *10, *35, *41, *CYP3A4**1B, *EPXH1 HYL**2 y *3 por PCR en tiempo real. La delección de *GSTM1* (*0) se analizó por PCR-multiplex. Se recolectaron muestras de orina de 32 sujetos y se evaluó el 1-OHP urinario por HPLC/fluorescencia. La media geométrica de 1-OHP en Tepehuanos fue 537.56 ng/g de creatinina [95%IC (202.7-872.9)]. Según el NHANES 2009, los Tepehuanos están 6.44 veces más expuestos que el límite permitido. *GSTM1**0 predominó en el grupo de tepehuanos con niveles normales de 1-OHP (82.6%, p=0.013). Además, los portadores de la presencia de *GSTM1* tuvieron 9.7 veces mayor riesgo de presentar valores altos de 1-OHP [95%IC (1.024-93.070), p=0.04]. Finalmente, los análisis de correlación, agrupamiento, redes neuronales y regresión logística demostraron que las variables que más influyeron sobre los valores altos de 1-OHP fueron, en orden de importancia descendente, la presencia de *GSTM1*, *CYP1A1**2C, creatinina y finalmente, *EPXH1 HYL**2.

Palabras clave: HAPs, Tepehuanos, *CYP450*, *EPXH1*, *GSTM1*, 1-OHP.

ABSTRACT

The Tepehuano Amerindian indigenous group from Durango is exposed to xenobiotics like timber smoke which contains polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These are ambient air pollutants considered as public health hazards in Mexico. PAHs are highly reactive due to their enzymatic biotransformation; the representative pyrene is quantified in urine through its conjugated product hydroxypyrene (1-OHP), which is used as a biomarker of indirect exposure to PAHs. Therefore, the aim of this study was to determine the association of *CYP450*, *EPXH1* and *GSTM1* genetic polymorphisms with urinary levels of 1-OHP in the Amerindian group of Tepehuanos. Genotyping of 120 volunteers included polymorphisms of *CYP1A1**2C,*4, *CYP2D6**2A, *3, *4, *5, *6, *10, *35, *41, *CYP3A4**1B and *EPXH1 HYL**2 and *3 by real time PCR. Deletion of *GSTM1* (*0) was evaluated by PCR-multiplex. Urine samples were collected and stored from 32 subjects, and urinary levels of 1-OHP were evaluated by HPLC/fluorescence. The 1-OHP geometric mean was 537.56 ng/g of creatinine [95%IC (202.7-872.9)]. According to NHANES 2009, the Tepehuano natives are exposed 6.44 more times than its established risk limit. Null *GSTM1* predominated in the tepehuano group with normal levels of 1-OHP (82.6%, p=0.013). Besides, *GSTM1* presence carriers presented a risk of 9.7 more times of higher values of 1-OHP [95%IC (1.024-93.070), p=0.04]. Finally, correlation, cluster, neural network and logistic regression analyses probed that variables with the highest influence on abnormal 1-OHP levels in Tepehuanos were, in descendant importance order, the *GSTM1* presence, *CYP1A1* *2C, creatinine, and finally, *EPXH1 HYL* *2.

Key words: HAPs, Tepehuanos, *CYP450*, *EPXH1*, *GSTM1*, 1-OHP.

“ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES CYP450, EPXH1 Y GSTM1 CON NIVELES URINARIOS DE 1-HIDROXIPIRENO EN INDÍGENAS TEPEHUANOS”

I. INTRODUCCIÓN

En las áreas rurales de México, las comunidades indígenas dependen de la quema de biomasa, especialmente leña para cocinar y como sistema de calefacción mediante chimeneas rudimentarias. Estos combustibles sólidos son la fuente más extendida de contaminación del aire en el interior de las viviendas indígenas, en las que un solo cuarto sirve de cocina, comedor y dormitorio. El humo, producto de la combustión total o parcial de la biomasa, contiene una mezcla de compuestos orgánicos conocidos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

Los HAPs están formados por dos o más anillos bencénicos mono, bi o trisustituidos por elementos químicos que los hacen muy reactivos. Entre ellos destaca el pireno que puede ser cuantificado en la orina en forma de su metabolito monohidroxilado conocido como 1-hidroxipireno (1-OHP). El 1-OHP se usa como biomarcador indirecto del grado de exposición a HAPs y por su confiabilidad, se le considera un biomarcador de rutina en ambientes laborales y habitacionales (Jongeneelen et al. 2001).

Como muchos otros xenobióticos, los HAPs son químicamente inertes, y al ser biotransformados en el organismo sufren una activación y conjugación metabólicas que generan compuestos electrofílicos con gran afinidad por macromoléculas como proteínas y ADN. En poblaciones expuestas a HAPs se ha descrito un mayor riesgo de desarrollar cáncer y enfermedades cardiovasculares (Chau et al. 1993; Teo et al. 2006; Androupsoupoulous et al. 2009; <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/>, 2011; IARC, 2014 y TOXNET, 2014). El primer paso en el proceso de biotransformación de los HAPs, es la activación por oxidación mediada por las enzimas del citocromo P450, principalmente por la subfamilia CYP1A, que los transforma en diol epóxidos altamente reactivos. Las enzimas CYP2D6 y CYP3A4 realizan una oxidación parcial (Georgiadis et al. 2005; Lee et al. 2006; y Ahmtha et al. 2009). Posteriormente, la enzima epóxido hidrolasa microsomal 1 (EPHX 1) convierte a los diol epóxidos en trans dihidrodiol epóxidos, que son menos reactivos. Sin embargo, un proceso de oxidación posterior genera especies reactivas de oxígeno que pueden causar modificación oxidativa al ADN y a los lípidos (Palackal et al. 2002). Finalmente, los metabolitos intermediarios como los diol-epóxidos, son detoxificados a través de la conjugación con

glutación por las enzimas glutación S-transferasas GSTM1 y GSTT1 (Bartsch *et al.*, 2000 y Luch, 2005).

En humanos, la mayoría de los genes que codifican las enzimas que metabolizan HAPs son muy polimórficos. La variación genética puede ser un factor relevante en las diferencias interindividuales en el metabolismo de los HAPs y en las consecuencias que puedan tener para la salud. Por lo tanto, en este trabajo se determinó la asociación de polimorfismos en *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *EPHX1* y *GSTM1* con las concentraciones urinarias de 1-OHP en un grupo de indígenas Tepehuanos.

II. ANTECEDENTES

II.1. Población indígena de México

El término indígena significa originario de un país y es el empleado en las leyes e instituciones políticas de la República Mexicana con el fin de salvaguardar sus derechos e integrarlos a los grupos étnicos mestizos de este país (CDI, 2013).

Actualmente, en México habitan aproximadamente entre 6.5 y 6.6 millones de personas de origen indígena distribuidos en 62 lenguas (INEGI, 2009, 2010; CDI 2005, 2013). El 80% de la población indígena se concentra en los estados del Centro-Sur-Sureste del país. En el norte de México, el territorio montañoso de la Sierra Madre Occidental que atraviesa el estado de Chihuahua y el suroeste de Durango y Sonora, es compartido por grupos indígenas denominados Tarahumaras, Tepehuanos, Pimas y Guarijíos. De ellos, el grupo Tarahumara es el más numeroso y habita un espacio más amplio que los demás; por lo que a su territorio también se le denomina Sierra Tarahumara (CDI, 2013).

Los Tepehuanos del Sur que habitan el sur y sureste del estado de Durango, así como los estados de Nayarit y Zacatecas también se les llama O'dam para distinguirlos de los Tepehuanos del Norte, que habitan cerca de los Tarahumaras y que en algunos aspectos son parecidos a ellos. Por lo que los Tepehuanos del Sur representan un grupo que geográficamente se ha diferenciado de los Tarahumaras, y que también ocupa un amplio territorio de la Sierra Madre Occidental (CDI, 2013).

II.1.1. Tepehuanos del Sur

El grupo indígena de los Tepehuanos del Sur se asentó en la región montañosa y boscosa de la Sierra Madre Occidental, en la parte escarpada

del sur y sureste de Durango que provocó que estuvieran en relativo aislamiento; en consecuencia dificultó el mestizaje y preservó rasgos característicos de la etnia indígena Tepehuana ^(Reyes Valdez 2006). Los indígenas Tepehuanos viven en pequeñas comunidades y tienen rasgos étnicos únicos como su lengua, vestimenta y organización familiar, y comparten algunos rasgos genéticos con otros grupos amerindios ^(Fragoso et al. 2005; Montero et al. 2007). Del mismo modo, el aislamiento geográfico de estas comunidades hizo florecer y preservar su estilo de vida tradicional que incluye el uso de leña en estufas rudimentarias de piedra y barro para cocinar.

De acuerdo al Censo de Población y Vivienda de 2010, en Durango descendió el número de hogares que utilizan leña o carbón como combustible para cocinar. En un periodo de 20 años esta práctica presentó una reducción de 6.7 puntos porcentuales ^(INEGI, 2010). Sin embargo, el municipio del Mezquital, lugar de residencia de los Tepehuanos del Sur, es el tercer municipio de Durango que por vivienda habitada, utiliza mayor cantidad de leña como combustible (84.5% de la población) ^(INEGI, 2010). Cabe resaltar que en función del tamaño de la localidad, las que más usan leña o carbón son las comunidades rurales enclavadas o cercanas a la Sierra Madre Occidental con menos de 2500 habitantes ^(INEGI, 2010).

En referencia a la disposición de la basura, si bien en el estado de Durango lo más común es la recolección de basura a domicilio, sigue existiendo la quema de basura. Aunque el porcentaje de hogares donde se quema o entierra la basura descendió del 24.7% en el 2000 al 16.7% en el 2010, las zonas rurales serranas concentran este fenómeno por falta de un sistema de recolección a domicilio, debido a su lejanía y difícil acceso ^(INEGI, 2010 y SSD, 2014).

En cuanto al sistema de drenaje, su disponibilidad facilita condiciones sanitarias adecuadas de vida para las comunidades. La proporción de hogares que cuentan con el servicio de drenaje en el estado de Durango creció de un 54.4% en 1990 a un 73.5% en el 2000 y mejoró a un 88.5% en el 2010. El municipio que cuenta con el menor número de drenajes por casa habitada en todo el estado de Durango es el Mezquital; lo que significa que sólo el 30.7% de los hogares del Mezquital cuentan con este servicio ^(INEGI, 2010). De igual forma, la inaccesibilidad a las comunidades serranas se refleja también en este servicio.

En lo referente al servicio de agua potable, el municipio duranguense que cuenta con el menor número de casas habitación con este servicio es el Mezquital. Tan sólo el 34.2% de los hogares del Mezquital cuentan con agua entubada de la red pública ^(INEGI, 2010).

Otro indicador importante de la mejoría en los servicios básicos es el abastecimiento de energía eléctrica. La proporción de hogares que disponen de electricidad es muy bajo en localidades con menos de 2500 habitantes, en las que sólo el 88.7% cuentan con este servicio *(INEGI, 2010)*.

Un indicador más de los niveles de vida de las comunidades, es el material de elaboración del piso de las viviendas habitadas. El municipio del Mezquital es el que tiene el menor número de hogares con piso diferente al de tierra con 56.0%; es decir que el 44% de los hogares del Mezquital tienen piso de tierra *(INEGI, 2010 Y SSD, 2014)*.

La disponibilidad de los servicios básicos antes mencionados son indicadores básicos de los niveles de vida de las comunidades. La falta de éstos hace que las condiciones de higiene sean inadecuadas y que grupos vulnerables como niños y adultos mayores padezcan enfermedades relacionadas a la marginación y pobreza.

De acuerdo al último censo epidemiológico del 2013 de la Subdirección de Estadística e Informática de los Servicios de Salud de Durango, las principales causas de morbilidad general en el municipio del Mezquital, lo ocupan las infecciones respiratorias agudas, seguidas de las infecciones intestinales. La información completa se muestra en el siguiente cuadro.

CUADRO 1. PRINCIPALES CAUSAS DE MORBILIDAD GENERAL EN EL MUNICIPIO DEL MEZQUITAL, DURANGO, DEL 2013.

ORDEN DE IMPORTANCIA	CAUSA	TOTAL DE CASOS	TASA*
1	Infecciones respiratorias agudas	20,210	78,275.69
2	Infecciones intestinales	4,775	18,494.13
3	Infecciones de vías urinarias	1,535	5,945.23
4	Intoxicación por picadura de alacrán	1,314	5,089.28
5	Conjuntivitis	1,000	3,873.12
6	Úlcera, gastritis y duodenitis	872	3,377.36
7	Otitis media aguda	664	2,571.75
8	Gingivitis y enfermedad periodontal	508	1,967.54
9	Candidiasis urogenital	268	1,038.00
10	Amebiasis intestinal	157	608.08
11	Desnutrición leve	95	367.95

12	Tricomoniasis urogenital	90	348.58
13	Varicela	86	333.09
14	Escabiosis	68	263.37
15	Paludismo por <i>Plasmodium vivax</i>	66	255.63

- TASA por 100,000 habitantes
- FUENTE:DGE/SSD:SUIVE

Sin embargo, no existen estadísticas del Mezquital que distingan solamente a la etnia Tepehuana del resto de la población mestiza y de otros grupos indígenas que habitan ese municipio. Por lo que las estadísticas antes mencionadas incluyen a la población mestiza y a todos aquellos indígenas que tengan acceso a las unidades móviles de salud así como los centros de salud establecidos en dicho municipio.

Debido a que la principal fuente de exposición a HAPs en la población indígena Tepehuana es el humo resultante de la quema de biomasa que incluye leña, carbón y basura, es necesaria la descripción de las características de estas fuentes de exposición.

II.2. Contaminantes presentes en el humo de la quema de biomasa y basura.

La combustión de la leña, el carbón y basura emite una mezcla compleja de compuestos cuya composición química y propiedades puede variar ampliamente en función de las condiciones de combustión total o parcial y del tipo de material iniciador de esta reacción. Entre los subproductos resultantes se incluye el carbón negro, monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre (NO_x y SO₂, respectivamente), aldehídos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles, dioxinas cloradas, polvo fino, residuos de asbesto y plomo, material de partículas resuspendidas en el aire (con diámetros <10µm, PM10), radicales libres, entre otros (IARC, 1985; Viegi et al. 2004; WHO, 2005; EPA, 2009; Vahlsing et al. 2010; Boogard et al. 2011; e INEEC, 2012).

II.2.1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los HAPs agrupan a una amplia gama de compuestos orgánicos formados por dos o más anillos bencénicos fusionados y dispuestos en forma lineal, angular o en racimo (Sims et al. 1983 y Cerniglia 1992). Debido a su aromaticidad y a su estructura hidrocarbonada, los HAPs se dividen en dos grandes categorías. La primera incluye a los compuestos de bajo peso molecular formados por menos de cuatro anillos bencénicos; en tanto que la segunda, agrupa a los

compuestos de peso molecular alto de cuatro o más anillos bencénicos (Fig. 1). A medida que el número de anillos bencénicos aumenta, tanto la solubilidad en agua como la volatilidad disminuyen (Sims et al. 1983; Cerniglia 1992; y Wilson et al. 1993). Los HAPs de más de cuatro anillos bencénicos persisten en el ambiente por más tiempo en forma resuspendida o bioacumulados en los sedimentos (Miller, 1981B; Jacob et al. 1986; y Cerniglia 1992), y se ha descrito que son carcinogénicos en humanos y animales (Gelboin 1980; Miller and Miller, 1981; Kawajiri et al. 1993; Livingstone, 1994; Sato et al. 1999; Bartsch et al. 2000; Jian et al. 2009; Androustopoulos et al. 2009; e IARC 2014), entre éstos se incluye el ampliamente estudiado Benzo[α]pireno (B[α]P) (Sims et al. 1974; Mahadevan et al. 2005; WHO 2005; Staal et al. 2006; Hockley et al. 2007; IARC 2014 y Toxnet 2014). La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC) lo ha clasificado dentro del Grupo 1; carcinogénico en humanos (IARC 2014).

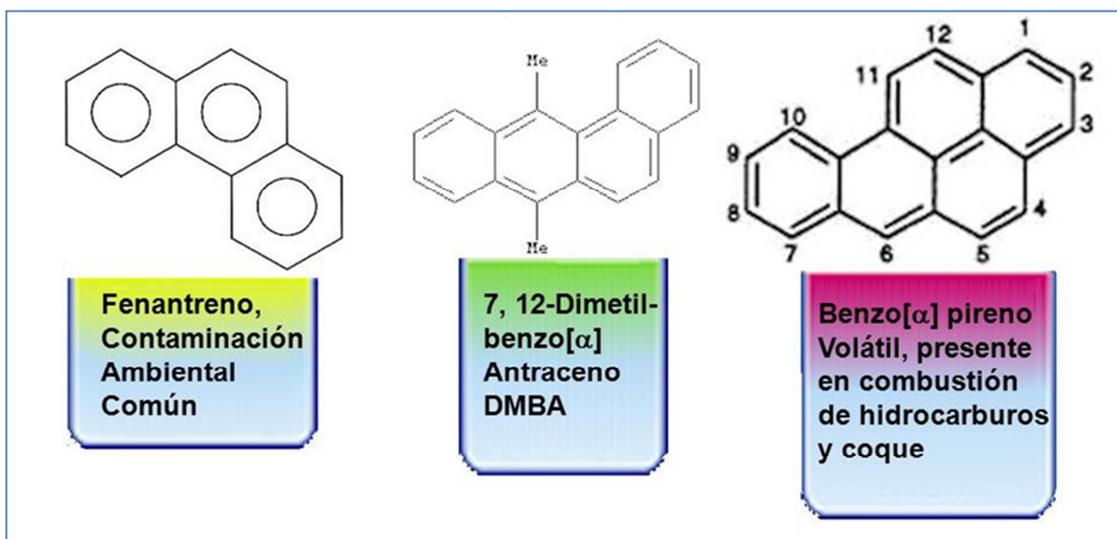


Figura 1. Estructura de los HAPs

II.2.2. Estructura química y propiedades físicas del HAP pireno.

Desde el punto de vista de la química orgánica, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se agrupan en la categoría de compuestos orgánicos que contienen sólo carbono e hidrógeno ordenados en dos o más anillos aromáticos fusionados (IARC, 2014). Entre ellos se encuentra el pireno; su fórmula molecular es $C_{16}H_{10}$ y está formado por cuatro anillos bencénicos ensamblados. A temperatura ambiente el pireno es un sólido que puede ser incoloro o de un amarillo pálido. Su peso molecular es 202.26 g/mol; sus puntos de ebullición y de fusión son $399^{\circ}C$ y $158^{\circ}C$, respectivamente (IARC 2014 y IUPAQ 2014). El pireno

puede ser cuantificado en la orina en forma de su metabolito monohidroxilado conocido como 1-hidroxipireno (1-OHP). El 1-OHP se usa como biomarcador indirecto del grado de exposición a HAPs y por su confiabilidad, se le considera un biomarcador de rutina en ambientes domésticos y laborales (Jongeneelen et al. 2001).

II.2.3. Fuentes de exposición a HAPs.

Debido a que los HAPs son el resultado de la combustión total o parcial de hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Yang et al. 1988), los seres humanos estamos expuestos a ellos de manera cotidiana. Las fuentes de exposición pueden ser el humo de tabaco y leña, el aire respirable, el agua y diferentes tipos de suelo. En la naturaleza, los HAPs se generan como resultado de incendios forestales, de la combustión del esquisto de pantanos o ciénagas, de las reservas de carbón, del petróleo crudo y del biocombustible de turba, entre otros (Tolbert et al. 1997; IARC, 2014).

Es necesario destacar que en ambientes domésticos y laborales, la exposición a HAPs se da a partir de la combustión de vehículos de gasolina y diésel, además de las emisiones industriales y del humo por combustibles sólidos al cocinar en espacios cerrados y abiertos. Una gran parte de la exposición humana a los HAPs proviene de la dieta debido al consumo de cárnicos ahumados y granos, cultivos vegetales en suelos contaminados con HAPs, aditivos alimenticios, conservadores y también de fármacos orales y de administración tópica (Schoket et al. 1993; Shimada et al. 1998; Phillips et al. 1999; Scherer et al. 2000; Georgiadis et al. 2005; Pavanello et al. 2005; Garte et al. 2007; y Kovalenko et al. 2009). Entre los ambientes laborales que son fuente de exposición a HAPs están la industria de la producción de gas, de carbón, de coque, de destilación de alquitrán de hulla, creosota, elaboración de asfalto, producción de aluminio, manufactura de electrodos de carbón y producción de carburo de calcio (IARC, 2014). Por lo que la actividad antropogénica ha incrementado la presencia de una amplia gama de HAPs en el medio ambiente.

II.2.4. Susceptibilidad pulmonar por exposición a HAPs

Entre los efectos nocivos al aparato respiratorio como resultado de la exposición a HAPs, se incluye irritación estacional, sensibilidad dérmica, hiperactividad bronquial, asma, EPOC y cáncer (Koren et al. 1992 y Zeliger 2003).

Las partículas suspendidas en el ambiente de $10\ \mu\text{m}$ o menos, también provocan irritación pulmonar cuando son inhaladas (Seagrave et al. 2006), lo cual se considera la primer causa de desarrollo de EPOC. Por otro lado, el humo de tabaco está presente en el 90% de los casos de EPOC (Arts et al. 2006). Mezclas

de HAPs en asbestos, carbón, algodón, granos, bentonita y otros residuos suspendidos en el aire también causan EPOC (Arts et al. 2006).

II.2.5. Susceptibilidad cardiovascular por exposición a HAPS

Los HAPS presentes en el humo de leña, tabaco y pesticidas son tóxicos cardiovasculares reconocidos (Penn et al. 1996; Anderson et al. 2003; Watson et al. 2006; Penn et al. 2007). La exposición prolongada a pesticidas que contienen HAPs puede provocar falla sistémica múltiple (Morgan et al. 1989). Por ejemplo, el compuesto organofosforado metil-paratión mezclado con HAPs puede provocar síncope cardíaco así como efectos respiratorios y neurológicos adversos (García et al. 2003). Finalmente, entre las enfermedades cardiovasculares asociadas al tabaco están infarto al miocardio, aterosclerosis, hipertensión, enfermedad arterial periférica y aneurismo aórtico (Brady et al. 1994; <<http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4545>>; y Teo et al. 2006).

II.3. Metabolismo de los HAPs

Los HAPs son moléculas procarcinogénicas ya que requieren de una biotransformación enzimática para convertirse en metabolitos carcinogénicos. Para ilustrar el metabolismo que sufren los HAPs se describe la biotransformación del B[a]P.

La superfamilia del Citocromo P450 (CYP450) es responsable, en gran medida, de la oxidación de HAPs. Las principales isoformas del CYP450 involucradas en la bioactivación de la mayoría de los HAPs, son CYP1A1 y CYP1B1 (Guengerich and Shimada, 1991; Kawajiri et al. 1993; Cascorbi et al. 1996; Shimada et al. 1996; Nebert, 2000; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004; Harrigan et al. 2004); otros CYP como CYP3A4 y CYP2D6, son relativamente más débiles para activar HAPs (Shimada et al. 1992; Guengerich, 1999; Lamba et al. 2002; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004; y Nebert et al. 2004). El B[a]P sufre una oxidación inicial (Fase I) por las enzimas CYP y es convertido en los enantiómeros (+) y (-)-Benzo(a)Pireno-7,8-epóxidos (Gelboin 1980; Miller and Whitlock, 1981; y Hakura 2013). Enseguida, estos epóxidos activados son hidrolizados por la Epóxido Hidrolasa 1 microsomal (EPHX1) que genera los dioles (+) y (-)-B[a]P-7,8-dihidrodiol (Decker et al. 2009 y Gelboin 1980). De forma análoga, los dioles son bioactivados por CYP y transformados en los compuestos electrofílicos (+) y (-)-B[a]P-7,8-dihidroxi-9,10-epóxido (B[a]PDE). Éstos son los principales metabolitos que reaccionan con las proteínas celulares y el ADN formando aductos, preferencialmente con residuos de guanina en la posición 2-desoxiguanosina (dGUO) (Fig. 2) (Gelboin 1980; Xue et al. 2005; Penning and Drury 2007; 9; Gelhaus et al. 2011).

En una segunda fase del metabolismo del B[a]P (Fase II), los intermediarios reactivos son conjugados con glutatión, el cual es un tripéptido citosólico de

naturaleza nucleofílica que se une covalentemente a los epóxidos. La reacción es catalizada por las enzimas citosólicas Glutatión-S-transferasas GSTM1 y GSTT1, las principales encargadas de la detoxificación de los B[a]P diol-epóxidos, que se excretan por vía renal (Sipes et al. 1991 y Seidegard and Ekstrom, 1997).

A continuación se describen algunas de las enzimas de Fase I y II, que participan en el metabolismo de HAPs.

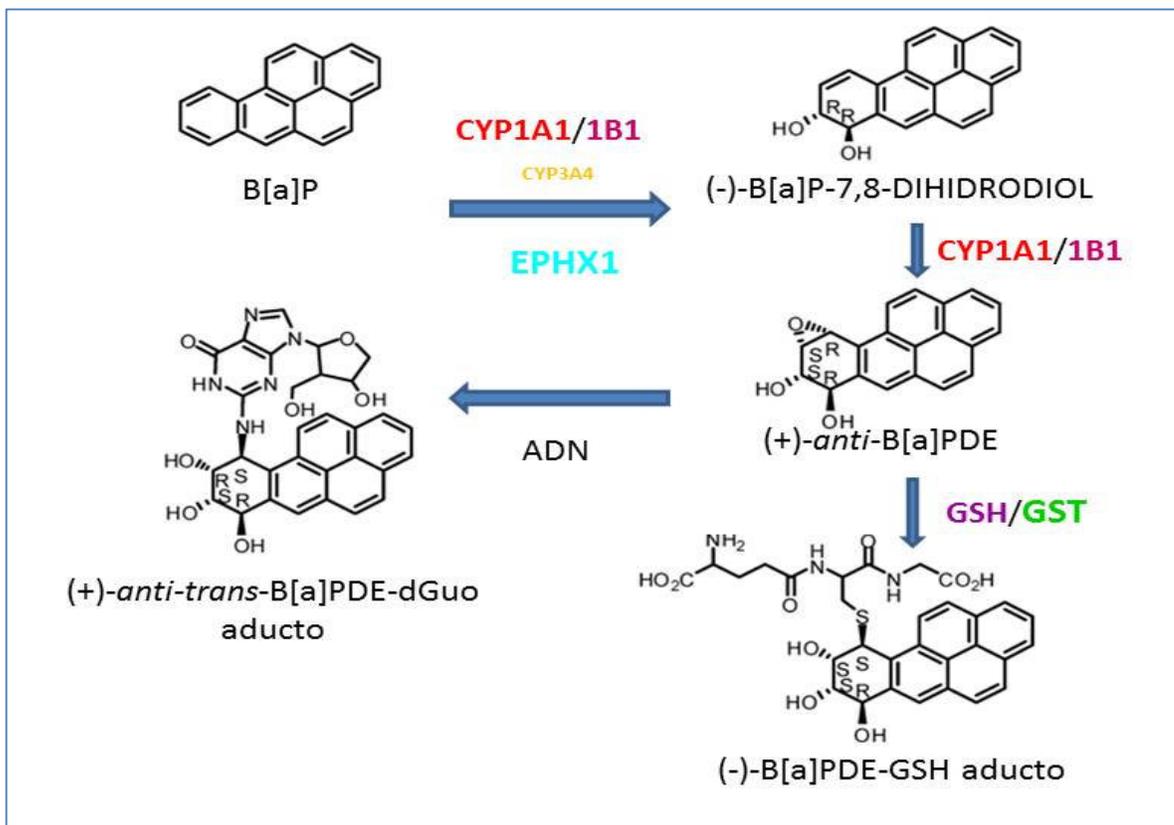


Fig. 2. Metabolismo de Fase I y II del B[a]P (Gelhaus et al. 2011).

II.3.1. Enzima CYP1A1

La enzima CYP1A1 se expresa en el hígado y en tejidos extrahepáticos como el tejido endotelial de la piel y del tracto gastrointestinal, placenta y pulmón (Kawajiri et al 1993, Shimada et al. 1998; Nebert et al. 2000). Entre los xenobióticos que son sustratos de CYP1A1 se encuentran los HAPs, el 3-metil-col-antraceno, el dimetil-antraceno, derivados halogenados como la tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD), entre otros (Whitlock, 1999; Nebert and Dalton, 2006; Ma and Lu, 2007; y Nukaya and Bradfield,

2009). Además, la enzima participa en el metabolismo de compuestos endógenos como el colesterol y otros ácidos grasos como el ácido araquidónico (AA), el ácido eicosapentanoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Schwarz et al. 2004; Schwarz et al. 2005; Fer et al. 2008; y Arnold et al. 2010). Asimismo, se han descrito contribuciones importantes de CYP1A1 en el proceso de señalización y producción de moléculas vaso-reactivas a partir de moléculas de ácidos grasos y esteroides (Choudahry et al. 2004).

Esta enzima está constituida de 512 aminoácidos y es codificada por el gen *CYP1A1* localizado en la región 15q24.1 (Kawajiri et al. 1993). *CYP1A1* está constituido por 5987 pares de bases y 7 exones (Fig.3) (Hildebrand et al. 1985; Kawajiri et al. 1993; y Hung et al. 2003).

La expresión de *CYP1A1* es inducida por HAPs mediante el receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), el cual es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas bHLH (dominio hélice-bucle-hélice)/PAS(Per-ARNT-Sim). Los HAPs son fuertes ligandos de AhR y forman el complejo HAP-AhR, el cual es traslocado al núcleo donde el AhR se une a su cofactor ARNT (translocador nuclear AhR). De esta forma, el receptor AhR regula la expresión de genes como *CYP1A1*, a través del elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) presente en su región promotora (Nebert et al. 2004; Nebert and Dalton, 2006; Hockley et al. 2007; Ozeki et al. 2011; y Michaelson et al. 2011).

Actualmente, se conocen más de diez polimorfismos en *CYP1A1* (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a1.htm>), pero solamente cuatro han sido los más estudiados debido a su asociación con cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) e hipertensión arterial (Sims et al. 1974; Choudahry et al. 2004; Mahadevan et al. 2005; WHO 2005; Schwarz et al. 2005; Staal et al. 2006; Hockley et al. 2007; Fer et al. 2008; IARC 2014 y Toxnet 2014).

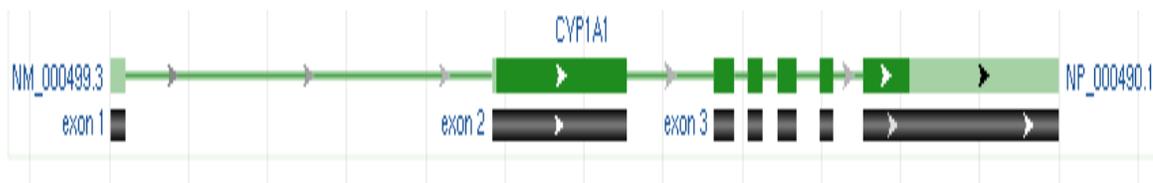


Figura 3. Esquema del gen *CYP1A1*.

El polimorfismo 3798T>C (rs4646903, *CYP1A1**2A) localizado en la región 3' no codificante del gen (Cascorbi et al. 1996), conduce a una falla en la capacidad de inducción (Crofts et al. 1994 y Kiyohara et al. 1998). Por otro lado, el polimorfismo 2454A>G (Ile462Val, rs1048943, *CYP1A1**2C) localizado en el exón 7, se asoció con un

incremento en la inducibilidad del gen y presentó 6 a 12 veces más actividad enzimática que el alelo silvestre (Kisselev et al. 2005; Hayashi et al. 1991; Kawajiri et al. 1993). Éste polimorfismo se encuentra normalmente ligado a 3798T>C, y ambos generan el alelo *CYP1A1*2B* (Hayashi et al. 1991 y Cascorbi et al. 1996) cuya inducibilidad es alta (Crofts et al. 1994). El cambio 2452C>A (T461N, rs1799814, *CYP1A1*4*) en el exón 7 (Crofts et al. 1993; Crofts et al. 1994 y Cascorbi et al. 1996), afecta el sitio de unión al grupo hemo (Cascorbi et al. 1996; Bartsch et al. 2000 y Hung et al. 2003). *CYP1A1*4* se ha asociado con una mayor predisposición a padecer cáncer de pulmón entre fumadores activos (11 veces más riesgo) y pasivos (28 veces más riesgo) de origen mestizo mexicano (Gallegos-Arreola et al. 2008).

II.3.2. Enzima CYP2D6

La enzima CYP2D6 está involucrada en el metabolismo de aproximadamente el 25% de los fármacos mas usados en la práctica clínica (Ayesh et al. 1984; Bertilsson et al. 2000; y Autrup et al. 2000). Además, es responsable de la biotransformación de nitrosaminas como la 4-metilnitrosamino-1(3-piridil)-1-butanona) (NNK) del humo de tabaco (Crespi et al. 1991; y Abdel-Rahman et al. 2000). Esta enzima se expresa en el hígado principalmente; pero también se encuentra en órganos extrahepáticos como el cerebro, riñón e intestino. Durante el embarazo su expresión se incrementa (Zanger et al. 2004; Kirschheiner et al. 2011; y Koh et al. 2014).

El gen *CYP2D6* está situado en la región cromosómica 22q13.121 (Fig 4), contiene 9 exones, un marco de lectura de 1491 pares de bases correspondiente a una proteína de 497 aminoácidos (Bertilsson et al. 1995).

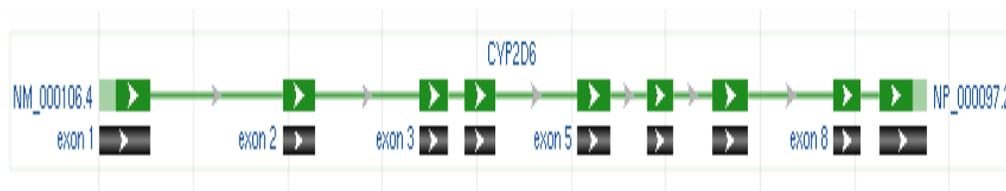


Figura 4. Esquema del gen CYP2D6.

En la actualidad se han descrito más de 130 polimorfismos en este gen (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Los alelos *CYP2D6*3*, **6*, **10* y **41* provocan una disminución de la actividad enzimática, y el alelo *CYP2D6*4* una pérdida total de actividad. Las variantes *CYP2D6*2A* y **35* se han identificado en sujetos con una actividad incrementada con respecto a la enzima silvestre. Por lo tanto, de acuerdo al tipo de actividad que generan sus variantes alélicas, los

individuos se han clasificado como metabolizadores lentos, intermedios, rápidos o ultrarápidos de sustratos de ésta enzima (Sachse et al. 1997; Bradford et al. 2002; y Luo et al. 2011)

II.3.3. Enzima CYP3A4

Esta enzima se expresa principalmente en hígado e intestino delgado de humanos (Shimada and Guengerich, 1989), además de la glándula adrenal, próstata (Koch et al. 2002), tejido pulmonar, tejido mamario (Kapucuoglu et al. 2003), riñón y linfocitos. Su expresión es 1.5 a 2 veces mayor en mujeres que en hombres (Wolbold et al. 2003). Esta enzima participa en el metabolismo de más de la mitad de los fármacos prescritos actualmente (Keshava et al. 2004), y está involucrada en la bio-activación de una gran cantidad de procarcinógenos como los HAPs-dihidrodióles y nitrosaminas como la NNN (N'-nitrosornicotina) (Patten et al. 1999). Se ha descrito una amplia variación interindividual en sus niveles de expresión en hígado humano (40 veces) y especímenes de intestino delgado (17 veces) (Shimada et al., 1994; Paine et al., 2006), y una variación de 10 veces en el metabolismo de sustratos de CYP3A4 in vivo (Thummel et al., 1998). Esta variación se ha adjudicado en parte a la presencia de polimorfismos genéticos.

El gen *CYP3A4* se localiza en el brazo largo de la región 21.1 del cromosoma 7, y contiene 13 exones (Fig. 5) (Lamba et al. 2002). En la actualidad se han descrito más de 78 polimorfismos de este gen (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>). Uno de los más frecuentes presenta un cambio en la posición -392A>G (rs2740574, *CYP3A4*1B*) (Rebeck et al. 1998; Paris et al. 1999 e Ingelman-Sundberg 2003). Esta región se conoce también como elemento específico para nifedipina, ya que los individuos que poseen este polimorfismo presentan una mayor oxidación de éste fármaco (Rebeck et al. 1998; Wandel et al. 2000 y Klein and Zanger, 2013).

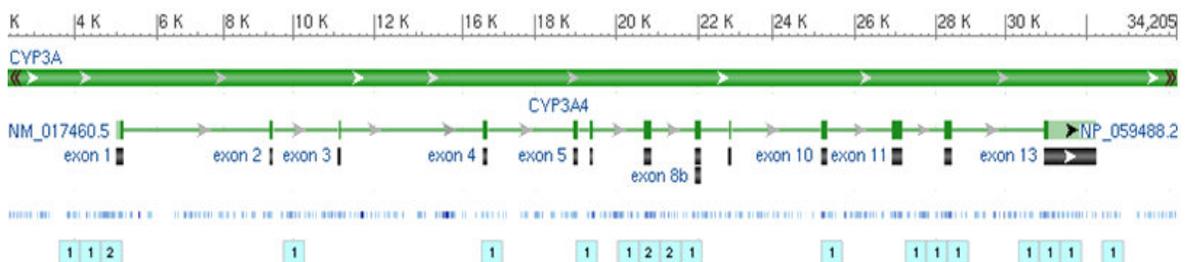


Figura 5. Esquema del gen *CYP3A4*.

*CYP3A4*1B* se ha asociado con una incidencia alta de cáncer de próstata en diferentes grupos étnicos (Rebbeck et al. 1998; Zeigler et al. 2002; Zhou et al. 2013; y He et al. 2014), con leucemia en individuos tratados con epipodofilotoxina (Lamba et al. 2002) y con desarrollo prematuro de la pubertad (Lamba et al. 2002; Rebbeck et al. 1998 y Felix et al. 1998). Además, se ha descrito que éste polimorfismo aumenta el riesgo de padecer cáncer de pulmón en mujeres fumadoras de más de 20 cajetillas al año (Dally et al. 2003). Sin embargo, los resultados aún son controversiales (Azarpira et al. 2011).

II.3.4. Enzima Epóxido hidrolasa

Se ha caracterizado un gran número de epóxido hidrolasas en función de sus propiedades inmunológicas, pesos moleculares y de su especificidad de sustratos única. Entre las que destacan las formas microsomal (EHm) y la soluble (EHs) (Kroetz et al. 1993).

II.3.4.1. Epóxido hidrolasa microsomal

La forma microsomal se expresa principalmente en el hígado, pero una alta actividad de EHm se ha visto en el cerebro humano y en pulmón. Niveles más bajos se han encontrado en glándula adrenal, riñón, intestino, corazón y próstata (Glatt et al. 1983; Papadopoulos et al. 1984; Seidegard et al. 1984; Ratanasavanh et al. 1986; Gheris-Egea et al. 1993; Papadopoulos et al. 1994; y Coller et al. 2001). Se ha descrito que sus niveles de expresión en hígado son 50% más altos en hombres que en mujeres; pero en riñón es ligeramente más alta en mujeres. Sin embargo, su expresión no presenta diferencias por género en pulmones y en glándula adrenal (Thomas et al. 1990). La EHm convierte a los epóxidos, que son productos de la degradación de HAPs y de otros contaminantes ambientales, en trans-dihidrodiolés, que son menos reactivos y pueden ser más fácilmente conjugados y excretados (Oesch, 1973; Seidegard et al. 1997; Argiriadi et al. 1999; y Decker et al. 2009). Sin embargo, esta enzima también participa en la activación de epóxidos (Armstrong, 1987; Arand et al. 2003a y Arand et al. 2003c). Además, EHm interviene en la hidrólisis de arenos, alquenos, epóxidos alifáticos y aromáticos, que resultan de la bioactivación de HAPs y amins aromáticas, principalmente (Guengerich et al. 1982; Seidegard et al. 1997; Sachse et al. 2002 y Cheng et al. 2004).

La proteína EHm está constituida por 455 aminoácidos y es codificada por el gen *EPHX1*, localizado en la región cromosomal 1q42.1 (Fig. 6) (Falany et al. 1987). Se han descrito dos variantes alélicas en la región codificante del gen *EPHX1* que se han asociado con el metabolismo de xenobióticos de carácter tóxico (Hasset et al. 1994; y Omiecinski et al. 2000).

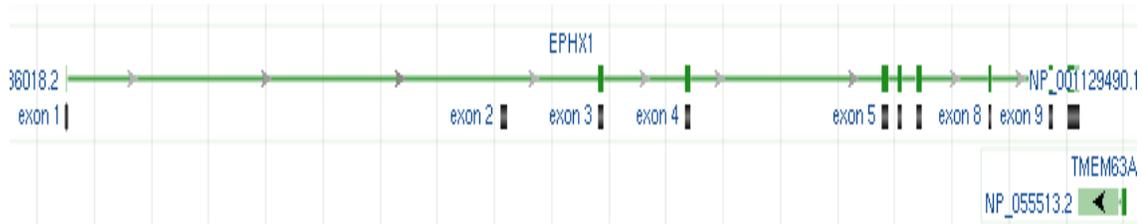


Figura 6. Esquema del gen *EPHX1*.

La primera variante corresponde al cambio 337T>C (Tyr113His, rs1051740) en el exón 3, identificada como *EPXH1 HYL*2* o alelo lento. Se ha demostrado mediante ensayos *in vitro*, que éste alelo produce una enzima con ~60% menos actividad que la enzima silvestre (Hassett et al. 1994). La forma homocigota de esta variante se ha relacionado con cuadros severos de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Cheng S et al. 2004). *EPXH1 HYL*2* también se ha asociado con mayor susceptibilidad a los efectos genotóxicos de HAPs en trabajadores de minas de coque en China (Leng et al. 2004). Además, en población Caucásica *HYL*2* se asoció significativamente con una mayor cantidad de aductos de glicidamida-hemoglobina/acrilamida-hemoglobina, resultantes de una dieta rica en carbohidratos (Duale et al. 2009). Finalmente, se ha descrito que *HYL*2* es un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer colorrectal en Caucásicos, debido al consumo de HAPs y aminas heterocíclicas en la dieta (Kiss et al. 2007), así como con cáncer de pulmón y cáncer esofágico (Gemignani et al. 2007; Tan et al. 2014).

El segundo polimorfismo localizado en el exón 4, es el cambio 415A>G (H139A, rs2234922), conocido como *HYL*3* o alelo rápido, ya que la actividad enzimática aumenta más de 25% con relación a la enzima silvestre, de acuerdo a ensayos *in vitro* (Hassett et al. 1992). *HYL*3* se asoció con un riesgo elevado de cáncer esofágico en población indú que mastica betel quid con tabaco (gutkha) (Ihsan et al. 2010), aunque en otras poblaciones el riesgo es bajo y o no representa un factor de riesgo (Zhao et al. 2013; Tan et al. 2014). La forma heterocigota u homocigota de *HYL*3* ejerció un efecto protector contra EPOC en población asiática, pero fue un factor de riesgo en población Caucásica (Hu et al. 2008). Finalmente, un meta-análisis demostró que este polimorfismo podría tener un efecto protector contra cáncer colo-rectal (Liu et al. 2012).

II.3.5. Familia enzimática de las Glutación S-Transferasas (GSTs)

Las Glutación S-Transferasas (GSTs) [EC 2.5.1.18] pertenecen a una amplia familia de enzimas citosólicas multifuncionales de Fase II, encargadas de la detoxificación de compuestos carcinógenos (Jakoby et al. 1978; Mannervik et al. 1985; Mannervik and Danielson, 1988; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html>); Kovalenko et al. 2009 y Tang et al. 2010). Estas enzimas catalizan la conjugación de una amplia gama de compuestos electrofílicos tanto exógenos como endógenos, al solubilizarlos con el agente endógeno glutación sulfidrihilo (GSH) (Strange et al. 2000). Entre sus sustratos destacan productos del estrés oxidativo, óxidos de arenos, acetaldehídos, isotiocianato de bencilo y difenilo, dihalídidos de alquilo, fármacos de uso clínico, pesticidas y toxinas ambientales derivadas de una amplia gama de HAPs (Mannervik and Danielson, 1988; Hayes y Pulford, 1995; Strange et al. 2000). Estos compuestos inducen la expresión de las GSTs, además de otros compuestos que no son sus sustratos como los fitoquímicos y el H₂O₂ (Talalay, 2000 y Dusinska et al. 2012). Cabe añadir que las GSTs participan en procesos de reparación del ADN y de bases oxidadas, a través de procesos de señalización celular (Dusinska et al. 2012). Debido a esto, las enzimas GSTs pueden tener un papel crucial en la susceptibilidad a cáncer (Hayes y Pulford, 1995; y Seidegard et al. 1997).

En la actualidad se conocen 8 clases distintas de enzimas GSTs que se han identificado como alfa, kappa, mu, omega, pi, sigma, theta y zeta (Seidegard et al. 1997; Rezka and Wasowicz, 2001). Se han descrito cinco genes de la clase mu de GST clasificados a partir de M1 hasta M5 (Fig. 7) localizados en tándem en la región cromosómica 1p13.3 comprendida por 40Kbs (Seidegard et al. 1997; Strange et al. 2001 y Frova 2006).

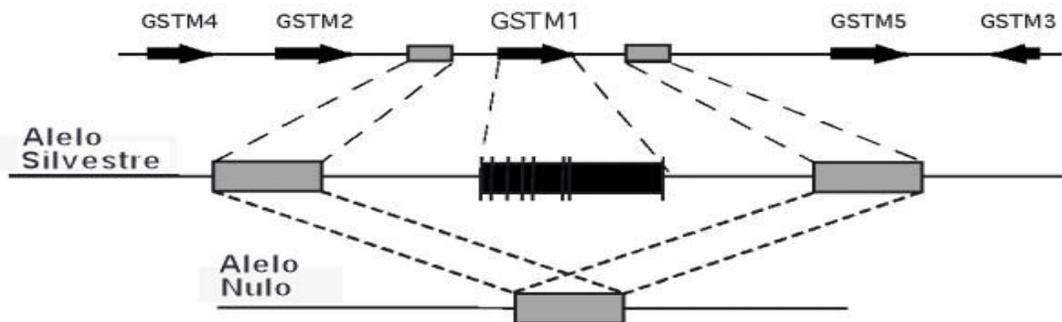


Figura 7. Esquema de los genes *GSTM*.

II.3.5.1. Glutación S-Transferasa clase Mu

La enzima citosólica GSTM1 se expresa principalmente en hígado, y en menor medida, en pulmón (Hayes and Pulford, 1995), tejido uroepitelial (Matic et al. 2014), tejido gástrico (Meng et al. 2014), colon, pecho, glándulas salivales (Parl, 2005; Bolt and Thier, 2006; y Kondo et al. 2009) y leucocitos (Brockmüller et al. 1992 y Strange et al. 2000).

El gen *GSTM1* codifica para una enzima de 219 aminoácidos. Se han identificado variantes alélicas del éste gen como *GSTM1**A, *B, y *0. *GSTM1**0 representa la delección completa del gen y por ende la ausencia total de la proteína (Xu et al. 1998). Esta delección es un factor de susceptibilidad a los efectos tóxicos derivados de la biotransformación de xenobióticos (Lee et al. 2008; Wang et al. 2008; Quiñones et al. 2006; Seidegard et al. 1997 y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Por ejemplo, *GSTM1**0 se ha asociado con un riesgo elevado de padecer diferentes tipos de cáncer, en fumadores activos y pasivos (Hayes 1995; Bennet 1999), así como con una respuesta bronquial incrementada en individuos que cocinan con gas natural (Amaral et al. 2014).

III. JUSTIFICACIÓN

La contaminación del aire es un grave problema de salud pública en México. La combustión de biomasa es una de las principales fuentes de contaminación del aire en el interior de las viviendas, y una práctica común en la población indígena. Dicha combustión, emite cantidades importantes de HAPs que son metabolizados por diversas enzimas como CYP450, EPXH1 y GSTM1. El metabolismo de HAPs genera metabolitos altamente reactivos, capaces de reaccionar con macromoléculas biológicas. Los polimorfismos en genes que codifican enzimas metabólicas, se han asociado con el desarrollo de diferentes padecimientos en individuos expuestos a HAPs. Por lo tanto, su evaluación en la población indígena Tepehuana y la estimación del nivel de exposición a HAPs, resulta importante para determinar la susceptibilidad individual a los efectos tóxicos de estos contaminantes.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre los polimorfismos de *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *EPXH1* y *GSTM1* con los niveles urinarios de 1-OHP, en una población indígena de origen Tepehuano de Durango?

V. HIPÓTESIS

Los polimorfismos de *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *EPXH1* y *GSTM1* se asocian con los niveles urinarios de 1-OHP en un grupo indígena de origen Tepehuano del estado de Durango.

VI. OBJETIVOS

VI.1. Objetivo general

Determinar la asociación de los polimorfismos de los genes *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *EPXH1* y *GSTM1* con los niveles urinarios de 1-OHP en una población indígena Tepehuana de Durango, México.

VI.2. Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia alélica y genotípica de las variantes
 - *CYP1A1**2C y *4
 - *CYP2D6**2A, *3, *4, *6, *10, *35 y *41
 - *CYP3A4**1B
 - *HYL**2 y *HYL**3 de *EPXH1*
 - *GSTM1**0
2. Determinar los niveles urinarios de 1-OHP en la población indígena Tepehuana
3. Establecer la asociación entre los polimorfismos estudiados y los niveles de 1-OHP urinario en la población indígena Tepehuana.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1. Diseño Experimental.

Estudio descriptivo, comparativo y transversal-correlacional.

VII.2. Población de estudio

Se estudiaron individuos Tepehuanos con edades entre 18 y 90 años de edad de la Comunidad de "Duraznitos", perteneciente al municipio del Mezquital, al sur del estado de Durango.

VII.2.1. Tamaño de muestra.

Para calcular el tamaño de muestra se usó la fórmula para una muestra infinita (Devore, 2001; y Johnson y Kubi, 2004) con un intervalo de confianza del 95% y un error muestral del 5%. Se calculó un tamaño de muestra de 113 voluntarios a partir de la frecuencia del alelo *CYP3A4*1B*, que se reportó anteriormente en Tepehuanos (Reyes-Hernández et al. 2008).

VII.3. Criterios del estudio

VII.3.1. Criterios de inclusión

- Individuos aparentemente sanos.
- Pertenecientes al grupo Tepehuano.
- Ancestría indígena de tres generaciones.
- De 18-90 años de edad.
- Individuos en condiciones de ayuno.
- Que firmaron la carta de consentimiento informado.

VII.3.2. Criterios de exclusión

- Individuos mestizos.
- Individuos de un grupo indígena diferente al Tepehuano.

VII.3.3. Criterios de eliminación

- Muestras de sangre insuficiente.
- Muestras de orina contaminada.
- Que retiren su consentimiento informado.

VII.4. Variables del estudio

VII.4.0. Tipos de variables

Las variables se clasificaron en continuas y discretas pudiendo ser numéricas, ordinales o categóricas (Devore, 2001; y Johnson y Kubi, 2004) de acuerdo a la naturaleza de las mismas y al tipo de análisis descriptivo, multivariante o predictivo.

VII.4.1. Variable dependiente

Niveles de 1-OHP urinario.

Esta variable se midió de acuerdo a los niveles urinarios de 1-OHP mediante el método enzimático propuesto por Jongeneelen con algunas modificaciones (Jongeneelen, 2001).

VII.4.2. Variables independientes

Polimorfismos del *CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *EPXH1* y *GSTM1*.

VII.4.3. Variables intervinientes

- **Sexo**

Se registró de acuerdo al género masculino y femenino.

- **Edad**

Para fines de este estudio se consideró la edad en años cumplidos de acuerdo a la fecha de nacimiento.

- **Masa corporal**

Para fines de este estudio, la masa corporal se midió con una báscula analítica, previamente calibrada; el voluntario se colocó en posición totalmente recta paralela a la pared, de frente a la báscula con la vista fija en un plano horizontal. Con ambas manos extendidas cuyas palmas descansaron lateralmente en los cuádriceps; con los talones ligeramente separados, los pies formando una V y sin hacer movimiento alguno ^(Aparicio et al. 2004). El resultado se expresó en kilogramos (kg).

- **Talla**

Para fines de este estudio se determinó la talla de acuerdo a la estatura medida con una cinta métrica expresada en metros, se midió a las personas de pie sin calzado y se determinó la estatura desde el talón hasta la parte superior de la cabeza. El resultado se expresó en metros (m).

- **Diámetro de cintura**

Fue medido con el individuo erguido y relajado, de perfil; con ambos brazos descansando sobre los cuádriceps y abdomen totalmente descubierto. Se colocó la cinta sin comprimirla alrededor de la cintura para medir la circunferencia y se tomó la lectura correspondiente en centímetros (cm) ^(Aparicio et al. 2008).

- **Índice de masa corporal (IMC)**

Éste fue determinado de acuerdo al criterio de la organización mundial de la salud por medio de la fórmula: $IMC = \text{Masa corporal (kg)} / (\text{talla m}^2)$ ^(Aparicio et al. 2004). Para fines de este estudio se consideró obesidad a los valores de IMC mayores o iguales a 30.

- **Perfil Hepático**

Se midió de acuerdo a los niveles séricos de Aspartato aminotransferasa (AST) y Alanina aminotransferasa (ALT) mediante técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del rango de referencia de ALT (5- 40U/L) y de AST (7-41U/L).

- **Perfil Lipídico**

TRIGLICERIDOS. Se consideraron triglicéridos totales a los valores séricos de triglicéridos en suero venoso determinados mediante técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del rango de referencia 40-199 mg/dL.

COLESTEROL. Se consideró colesterol total a los valores séricos de colesterol determinados por técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del rango de referencia 150-199 mg/dL.

LIPIDOS DE BAJA DENSIDAD (por sus siglas en ingles LDL) se determinaron mediante los valores séricos de LDL en suero venoso utilizando técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del valor de referencia ≤ 159 mg/dL.

LIPIDOS DE ALTA DENSIDAD (por sus siglas en ingles HDL) se determinaron mediante los valores séricos de HDL en suero venoso utilizando técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del rango de referencia para hombres 35-55 mg/dL y para mujeres 45-65 mg/dL.

LIPIDOS DE MUY BAJA DENSIDAD (por sus siglas en ingles VLDL) se determinaron mediante la siguiente fórmula: los valores séricos de Triglicéridos/5 en suero venoso utilizando técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del rango de referencia favorable 6-34 mg/dL.

- **Glucosa**

Se consideró la medición de glucosa en ayuno por los valores séricos de glucosa determinados por técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del rango de referencia 60-99 mg/dL.

- **Creatinina**

Se consideró la medición de creatinina a los valores séricos de creatinina determinados por técnicas enzimáticas. Tomándose como valores normales los encontrados dentro del rango de referencia para hombres de 0.7-1.3 mg/dL y para mujer de 0.6-1.1 mg/dL.

VII.5. Consideraciones éticas

- El proyecto fue autorizado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General de Durango, reconocido por la SSA, dependencia del Gobierno Federal, tomando como marco de referencia la Declaración de Helsinki (WMA) del año 2000; norma obligada, doble estándar (*Declaración de Helsinki, 2000*).

VII.6. Métodos

VII.6.1. Extracción de ADN

Se recolectaron 5mL de sangre periférica venosa de cada voluntario en tubos tratados con EDTA. El ADN genómico se extrajo de sangre total por medio del kit QIAmp DNA Blood de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Qiagen™, Hilden, Germany).

VII.6.2. Determinación de la calidad y pureza del ADN

La integridad del ADN se confirmó con electroforesis en geles de agarosa al 1%. Posteriormente, el ADN se cuantificó en un NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific™).

VII.6.3. Genotipificación

La genotipificación se llevó a cabo mediante PCR en tiempo real semicuantitativo (qRT-PCR) en un termociclador StepOne™ (Applied Biosystems™ Ver 2.2) en condiciones estándar. Para la determinación de las variantes alélicas se usaron sondas MGB TaqMan™, cuyo identificador de ensayo se describe entre paréntesis: *CYP1A1*2C* (C_25624888_50), *CYP1A1*4* (C__8879521_40); *CYP3A4*1B* (01_CYP3A4-NIF); EPXH1 Exon 3 *HYL*2* (C__14938_30) y EPXH1 Exon 4 *HYL*4* (C__11638783_30), *CYP2D6*3* (C__32407232_50), *4 (C_27102431_DO), *6 (C__32407243_20), *10 (C_11484460_40), *35 (C__27102444_80), *41 (C_34816116_20) y *2A (C_32407252_30) (*Applied Biosystems protocols 2010*).

La determinación de *GSTM1*0* se llevó a cabo por medio de PCR Multiplex con dos pares de iniciadores específicos, uno para *GSTM1* y otro para β -actina como control interno. Con el fin de confirmar la delección génica de *GSTM1*, una segunda reacción de PCR se llevó a cabo usando otro par de iniciadores específicos para un fragmento más largo del mismo gen (cuadro 2) (*Luo et al. 2011*).

Cuadro 2. Iniciadores de PCR para la amplificación del gen *GSTM1*

INICIADOR	SECUENCIA	PRODUCTO (bp)
-----------	-----------	---------------

GSTM1-F1	5'-GCAGGAAACAAGGTAAAGG-3'	994
GSTM1-R1	5'-AGGCAGTAGAATCGCTTG-3'	
GSTM2-F2	5'-GAACTCCCTGAAAAAGCTAAAGC-3'	220
GSTM2-R2	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'	
β-ACTINA-F	5'-TGACGGTCAGGTCATCACTATCGGCAATGA-3'	260
β-ACTINA-R	5'-TTGATCTTCATCGTGATAGGAGCGAGGGCA-3'	

VII.6.4. Obtención, manejo y almacenamiento de la orina

Se obtuvieron muestras de orina en condiciones de ayuno de 32 individuos Tepehuanos. Las muestras se recolectaron en viales estériles para orina, luego se transfirieron a tubos falcon estériles de 50 mL a los que se les agregó una gota de HCl 6M para acidificar y conservar la muestra. Los viales fueron congelados en nitrógeno líquido para su transporte y posteriormente se almacenaron a -80°C hasta el momento de su análisis .

VII.6.5. Determinación de los niveles urinarios de 1-hidroxi pireno (1-OHP)

La cuantificación de los niveles urinarios del metabolito 1-OHP (*Jongeneelen 2001*), es un indicador válido y confiable de exposición a HAPs. De acuerdo al método descrito por Jongeneelen et al. 1987 y Kuusimäki et al. 2004, se tomaron 10 mL de orina en un tubo estéril y se mezclaron con un volumen igual de buffer de acetato de sodio (0.2mol/L, pH 5.0). La mezcla anterior se incubó a 37°C por 12 h con 30 µl de β-glucoronidasa/arilsulfatasa. Después de la incubación las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 20 min.

Luego el analito fue extraído en fase sólida con cartuchos C-18 eluido en metanol con 1% de ácido acético. El material fue concentrado a 1mL con nitrógeno, el cual se hizo pasar a través de filtros de fluoruro de polivinilideno (PDFV) (13mm, 0.45mm, Millex Durapore, Millipore, Bedford, Mass., USA). El concentrado se transfirió a viales silanizados.

El análisis se llevó a cabo en un equipo de HPLC (HP1100, Agilent Technologies), con un detector de fluorescencia (G1321A). Se utilizó una pre-columna Zorbax SB-C18 (4.6x125 mm diámetro y 5µm de espesor) y una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6x250 mm de diámetro y 5µm de espesor).

La temperatura de la columna se fijó en 40°C, el flujo de entrada se ajustó a 1mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µl. El eluyente se usó en una proporción de 88:12 metanol:agua y 1% de ácido ascórbico. El tiempo de corrida fue de 7 minutos y la presión se fijó en 76 psi. Se usó una longitud (λ) de 242 nm de excitación y de 390 nm de emisión. Los datos fueron recolectados y procesados con el software HPChemStation. La concentración del 1-HOP se cuantificó por medio del área del pico cromatográfico. Las

concentraciones urinarias de 1-OHP fueron ajustadas por creatinina urinaria. Los resultados obtenidos se muestran en $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina. El cuadro 3 muestra los parámetros de validación obtenidos para este análisis.

La determinación de la creatinina urinaria se hizo por el método colorimétrico de Jaffé ^(Tausky 1954) con un kit de creatinina. Bajo estas condiciones, los límites de detección y cuantificación fueron 1.0 y 3.6 nmol/L, respectivamente. El control de calidad certificado empleado fue el IRIS Clin Cal Recipe (Munich, Germany) 50013. 9.1 nmol/L of 1-OHP; la recuperación fue del 99%.

Cuadro 3. Parámetros de validación del método de HPLC para determinación del 1-OHP urinario.

Parámetros evaluados	Valores obtenidos
Precisión	83.15 \pm 14.93
Pendiente	2.88
Intercepto	7.28
Rango de linealidad	7.20 – 60 nmol/L
Coefficiente de correlación (r)	0.99
Error estándar (se) del intercepto	6.13
Desviación estándar del intercepto	13.71
Límite de detección (lod)	16.62 nmol/L
Límite de cuantificación (loq)	50.37 nmol/L

Para la determinación de los niveles urinarios de 1-OHP se utilizaron como referencia los valores reportados por “The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 2009) compilado por “The Centers for Disease Control and Prevention’s (CDC’s) National Center for Health Statistics” para población general expuesta al 1-OHP. El valor de corte en $\mu\text{mol/mol}$ creatinina para 1-OHP es de 0.0425, mientras que la media geométrica para la población general es de 83.4 ng/g creatinina.

VII.7. Análisis estadístico

- Se obtuvieron las medidas de tendencia central media, mediana, rango intercuartílico (IQR); y de dispersión, desviación estándar para describir a la población tepehuana analizada en el presente estudio.
- La comparación entre medidas antropométricas y bioquímicas estratificadas por sexo se hizo mediante una prueba de *t* de Student para muestras independientes ($p < 0.05$).
- Las frecuencias alélicas, genotípicas y de heterocigocidad se obtuvieron por el método del conteo de genes. La determinación del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se calculó por medio de la prueba de exactitud de Chi cuadrada (X^2), ($p < 0.05$).

- Para estimar las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas se usó la prueba X^2 de Pearson ($p < 0.05$).
- Los genotipos hallados fueron de utilidad para encontrar el desequilibrio de ligamiento o (Linkage Disequilibrium, LD) por sus siglas en inglés. D' se calculó, en caso de ser necesario, mediante la aplicación del software libre SNPStats (<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats>).
- También se utilizaron tablas de contingencia mediante la prueba de la Chi cuadrada X^2 , así como el análisis de riesgo para establecer asociaciones entre grupos de variables ($p < 0.05$).
- Fue necesario el cálculo de las medidas de similitud con base en la prueba de la Chi cuadrada X^2 , por medio de los coeficientes ϕ Phi de Pearson y V de Cramer.
- Los niveles urinarios de 1-OHP en 32 indígenas evaluados se mostraron en $\mu\text{mol/mol}$ creatinina y ng/g creatinina.
- Enseguida se analizaron las posibles correlaciones existentes entre conjuntos de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas con los niveles urinarios de 1-OHP; se empleó la correlación de Pearson y la de Spearman.

La correlación de Pearson se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$r = \frac{n \sum_{i=1}^{i=n} x_i y_i - \sum_{i=1}^{i=n} x_i \times \sum_{i=1}^{i=n} y_i}{\sqrt{\left(n \sum_{i=1}^{i=n} x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{i=n} x_i \right)^2 \right) \times \left(n \sum_{i=1}^{i=n} y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{i=n} y_i \right)^2 \right)}}$$

n - nº de pares de muestras
 x_i - valores de la variable x
 y_i - valores de la variable y

La correlación de Spearman se obtuvo a través del cálculo del coeficiente siguiente:

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^{i=n} d_i^2}{n^3 - n}$$

n = nº de pares de datos

d_i = diferencia de rangos en las variables del par i

- Después, se llevó a cabo un análisis canónico correlacional con el fin de encontrar correlaciones canónicas entre conjuntos de variables X y Y . Se buscó una posible combinación lineal de las Y a través de:

$$U_1 = a_1 y_1 + a_2 y_2 + \dots + a_q y_q$$

Así como una combinación lineal de las X por medio de:

$$V_1 = b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_p x_p$$

- Además, se realizó un análisis canónico correlacional no lineal (OVERALS) para analizar las correlaciones entre conjuntos de variables categóricas.

La correlación canónica por dimensión se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\rho_d = 2 \times E_d - 1$$

- También se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) con fines exploratorios.

Los componentes principales son las variables compuestas de:

$$Y_1 = X_{t_1}, Y_2 = X_{t_2}, \dots, Y_p = X_{t_p}$$

- Además, se realizó un análisis de componentes principales categórico (CATPCA) para analizar las variables de tipo categórico y la consiguiente reducción de los datos.
- También fue muy importante llevar a cabo un análisis de agrupamiento jerárquico con la finalidad de encontrar similitudes entre los conjuntos de variables analizados. De acuerdo al tipo de variables analizadas, la medida de distancia empleada fue:

MANHATTAN (o función de la distancia absoluta, o City-Block)

$$d_{ij} = \sum_{k=1}^t |X_{ik} - X_{jk}|$$

- Se empleó un análisis de redes neuronales con el fin de procesar una gran cantidad de datos mediante la simulación del funcionamiento de una red neuronal biológica. Éstas son ampliamente utilizadas en análisis predictivos debido a su potencia, robustez, flexibilidad y por supuesto, su fácil manejo. Por lo que se usó un modelo de Redes Neuronales de perceptrones multicapa (MLP, por sus siglas en inglés).

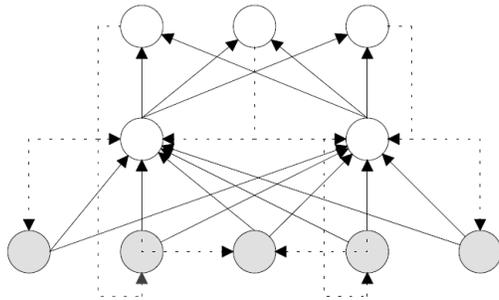


Ilustración 3.2.5.1.
Ejemplo de Modelo de red *back-propagation*
Nota: la línea discontinua representa el retroceso del error en el proceso iterativo.

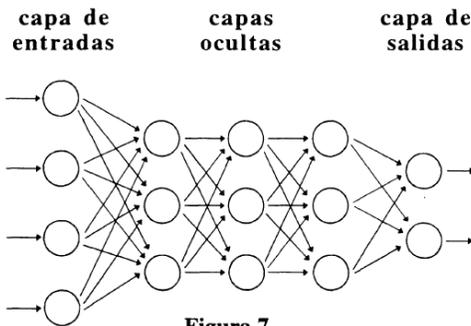


Figura 7.
Arquitectura de una Red Neuronal Artificial.

Se escogió el modelo de redes neuronales de perceptrón multicapa (MLP) con capa de entrada compuesta por cinco predictores, dos capas ocultas y con una partición igual al 50% de entrenamiento, 25% de muestra de prueba y el 25% restante de muestra de reserva, previa aleatorización de casos. La mejor arquitectura en este caso, fue con la función identidad y entrenamiento por lote.

- Finalmente, se empleó un análisis de regresión logística multivariada para analizar la asociación entre las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas del estudio con los niveles urinarios del 1-OHP. El cálculo se hizo bajo un nivel de confianza del 95% ($P < 0.05$). El modelo logístico multivariado que se empleó fue el siguiente:

Modelo logístico multivariante múltiple

$$y_i = \frac{\exp(\beta_{i,0} + \beta_1 x_1 + \beta_{i,2} x_2 + \dots + \beta_{i,k} x_k)}{1 + \exp(\beta_{i,0} + \beta_1 x_1 + \beta_{i,2} x_2 + \dots + \beta_{i,k} x_k)}$$

MODELO LOGÍSTICO MULTIVARIADO

Yi= Nivel crítico/no crítico de exposición al 1-OHP

PAQUETES ESTADÍSTICOS

Todos los procedimientos estadísticos se hicieron a través de los paquetes estadísticos SPSS (ver.17) y STATISTICA 7 (StatSoft, Inc. 2004, Tulsa, OK, United States).

VIII. RESULTADOS

VIII.1. Características de la población.

Se llevó a cabo una descripción de las características antropométricas y bioquímicas de los voluntarios de la población Tepehuana del Sur. En el cuadro siguiente se presentan los valores de la media, desviación estándar, mediana e IQR. Se puede destacar que en general se muestreó a una población de mediana edad, no obesa, con valores normales de creatinina y glucosa; así como de AST y ALT, entre otros (cuadro 4).

Cuadro 4. Descripción de las características antropométricas y bioquímicas de la población Tepehuana.

n = 120 tepehuanos				
VARIABLES	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MEDIANA	IQR*
Edad (años)	36.24	±13.82	35	15
Diámetro de cintura (cm)	79.00	±8.57	80	9
IMC	21.77	±4.75	22	5.1
Creatinina(mg/dL)	0.68	±0.32	0.7	0.2
Glucosa(mg/dL)	78.97	±15.10	77	22
Colesterol total (mg/dL)	157.17	±41.71	151	47
Trigliceridos(mg/dL)	113.50	±67.79	91	58
AST (TGO) (IU/L)	37.17	±22.86	31	15.1
ALT(TGP) (IU/L)	31.21	±34.43	25	15

LDL (mg/dL)	70.15	±23.47	69	35
HDL (mg/dL)	52.73	±12.74	49.8	17.2
VLDL (mg/dL)	23.07	±14.02	18.2	11.6

*IQR = Rango intercuartílico

De los resultados mostrados en el cuadro 4 resalta que la población tepehuana evaluada es una población adulta joven, con un IMC normal y con un diámetro de cintura aceptable. Sus valores de glucosa, ALT y AST son normales. Los valores de triglicéridos son normales. De acuerdo al rango intercuartílico (IQR), los valores más alejados entre el primer y el tercer cuartil se dieron para las variables de colesterol, triglicéridos y LDL.

También se realizó una estratificación por género de las variables antropométricas y bioquímicas para evaluar la condición de salud de los voluntarios tepehuanos. En el cuadro siguiente se observan las diferencias más relevantes sólo en dos variables, (prueba t de Student). El resto permaneció constante. Por lo que sólo se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres tepehuanos respecto a los niveles de creatinina y a los valores de HDL (cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación de las características antropométricas y bioquímicas entre mujeres y hombres tepehuanos (t de Student).

VARIABLES	n = 74 mujeres	n = 36 hombres	P
	tepehuanas	tepehuanos	
	MEDIA±DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MEDIA± DESVIACIÓN ESTÁNDAR	
Edad (años)	35.47 ± 14.46	36.83± 10.67	0.61
Diámetro de cintura (cm)	79.39± 8.57	81.53±7.40	0.22
IMC	22.34± 3.37	21.83±2.85	0.44
Creatinina(mg/dL)	0.67± 0.38	0.79±0.15	0.03*
Glucosa(mg/dL)	79.73± 15.87	78.53±12.51	0.69

Colesterol total (mg/dL)	157.91± 44.51	147.85±34.48	0.24
Trigliceridos(mg/dL)	114.40± 71.35	104.86±52.33	0.47
AST (TGO) (IU/L)	36.35±26.38	34.05±11.85	0.56
ALT(TGP) (IU/L)	40.73± 31.29	26.60±11.42	0.40
LDL (mg/dL)	70.22± 25.81	68.16±21.20	0.68
HDL (mg/dL)	53.42± 13.20	47.22±9.86	0.01*
VLDL (mg/dL)	22.88± 14.27	20.97±10.46	0.47

* $p < 0.05$ para datos bioquímicos al aplicar la prueba t de Student. AST=Aspartato aminotransferasa; ALT=Alanino aminotransferasa; LDL=low density lipoprotein; HDL=high density lipoprotein; VLDL=very low density lipoprotein.

VIII.2. Frecuencias alélicas y genotípicas (*ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS, BIOQUÍMICAS Y GENÉTICAS).

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos de *CYP1A1*, *CYP2D6*, *EPXH1* y *GSTM1* se muestran en los cuadros 6 y 7. Los alelos más frecuentes en el grupo Tepehuano fueron *GSTM1*0* (0.72), *CYP1A1*2C* (0.65), *EPXH1 HYL*2* (0.46) y *CYP2D6*2A* (0.20). Con excepción del alelo *CYP3A4*1B* (0.09), el resto de las variantes se presentaron con una frecuencia menor a 0.01, mientras que los alelos *CYP1A1*4*, *CYP2D6*3*, *CYP2D6*6*, *CYP2D6*35* y *EPXH1 HYL*3* no fueron detectados (cuadro 6).

Las frecuencias más altas de genotipos heterocigotos se obtuvieron con el alelo silvestre de *EPXH1* y su variante *HYL*2* (54.2%), alelo silvestre de *CYP1A1* y su variante **2C* (48.3%) y el alelo silvestre de *CYP2D6* y su variante **2A* (30%). El genotipo homocigoto para la variante *GSTM1*0* (72%) fue el más frecuente (cuadro 7). La población se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg ($p < 0.05$) para todos los polimorfismos evaluados, excepto para *GSTM1* que no se evaluó debido a que el ensayo de PCR empleado no permite discriminar a los individuos heterocigotos de los homocigotos.

Cuadro 6. Frecuencias alélicas de polimorfismos en *CYP1A1*, *CYP2D6*, *EPXH1* y *GSTM1* en 120 individuos Tepehuanos.

Gen	Alelo		IC 95%*
<i>CYP1A1*2C</i>	A	G	
	0.35	0.65	0.56-0.74
<i>CYP1A1*4</i>	C	A	
	1.0	0	-----
<i>CYP2D6*2A</i>	C	T	
	0.8	0.2	0.13-0.27
<i>CYP2D6*3</i>	A	delA	
	1.0	0	-----
<i>CYP2D6*4</i>	G	A	
	0.99	0.008	-0.01-0.03
<i>CYP2D6*6</i>	T	delT	
	1.0	0	-----
<i>CYP2D6*10</i>	C	T	
	0.99	0.008	-0.01-0.03
<i>CYP2D6*35</i>	G	A	
	1.0	0	-----
<i>CYP2D6*41</i>	G	A	
	0.99	0.008	-0.01-0.03
<i>CYP3A4*1B</i>	A	G	
	0.91	0.09	0.04-0.14
<i>EPXH1 HYL*2</i>	T	C	
	0.54	0.46	0.37-0.55
<i>EPXH1 HYL*3</i>	A	G	

	1.0	0	-----	
<i>GSTM1</i> *0	<i>Silv</i>	<i>-/-</i>		
	0.28	0.72	0.68-0.76	*IC del alelo mutado

Cuadro 7. Frecuencias genotípicas de polimorfismos en *CYP2D6*, *CYP1A1*, *EPXH1* y *GSTM1* en 120 sujetos Tepehuanos.

Gen	Genotipo	N	% (IC 95%)
<i>CYP1A1</i>	<i>*1/*1</i>	13	10.8 (5.3-16.4)
	<i>*1/*2C</i>	58	48.3 (39.4-57.3)
	<i>*2C/*2C</i>	49	40.8 (32.0-49.6)
<i>CYP2D6</i>	<i>*1/*1</i>	78	64.2 (55.6 – 72.7)
	<i>*1/*4</i>	1	0.8 (-0.8 – 2.45)
	<i>*1/*10</i>	1	0.8 (-0.8 – 2.5)
	<i>*2A/*41</i>	1	0.8 (-0.8 – 2.5)
	<i>*1/*2A</i>	30	0.3 (0.2 – 0.3)
	<i>*2A/*2A</i>	9	7.5 (2.7 – 12.2)
<i>CYP3A4</i>	<i>*1/*1</i>	99	82.5 (79.0 – 86.0)
	<i>*1/*1B</i>	21	17.5 (10.7 – 24.3)
<i>EPXH1</i>	<i>*1/*1</i>	32	26.7 (18.7 – 34.5)
	<i>*1/*3</i>	65	54.2 (45.2 – 63.1)
	<i>*3/*3</i>	23	19.2 (12.1 – 26.2)
<i>GSTM1</i>	<i>GSTM1+/+ y +/-</i>	33	27.7 (13.3 – 42.1)
	<i>GSTM1-/-</i>	87	72.2 (68.2 – 0.8)

**1 alelo silvestre*

VIII.2.1. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

En el contexto poblacional se evaluó el acervo alélico de cuatro genes (*CYP1A1*, *CYP2D6*, *CYP3A4* y *EPXH1*) de los indígenas tepehuanos del Sur de Durango para comprobar que dicho acervo no estuviese sometido a fuerzas estocásticas ni sistemáticas. En los cuadros 7 y 8 se observa la distribución alélica y genotípica de *CYP1A1*2C* de los indígenas tepehuanos. Los valores de los polimorfismos de *CYP2D6* y el polimorfismo de *CYP3A4* no se muestran ya que se han reportado en la literatura anteriormente.

Cuadro 8. Distribución alélica de *CYP1A1*2C* en indígenas tepehuanos por sexo.

ALELOS DE <i>CYP1A1</i>	HOMBRES	IC (95%)	MUJERES	IC (95%)
	TEPEHUANOS		TEPEHUANAS	
	n=36		n=74	
*1A	38.8	27.6- 50.1	35.7	28.1- 43.3
*2C	61.1	49.8- 72.4	64.3	56.7- 71.8

Los valores de los alelos están en %; IC (95%) Intervalos de confianza al 95%.

Cuadro 8. Distribución genotípica de *CYP1A1*2C* en indígenas tepehuanos.

GENOTIPOS DE <i>CYP1A1</i>	HOMBRES	MUJERES	P	
	TEPEHUANOS	TEPEHUANAS	HOMBRES	MUJERES
	n=36	n=74		
*1A/*1A	n=6	n=9		
	He=15.1; Ho=11.1	He=12.7; Ho=12.1		
*1A/*2C	n=17	n=34	0.8663	0.9866
	He=47.5; Ho=55.5	He=45.9; Ho=50.0		
*2C/*2C	n=13	n=31		
	He=37.3; Ho=33.3	He=41.3; Ho=45.9		

Los valores de los genotipos están en H(%). Heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad observada (Ho) y prueba del Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Como se puede apreciar en el cuadro anterior, los alelos y genotipos evaluados de CYP1A1 se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

También se evaluó la distribución alélica de *EPXH1* en ambos sexos (cuadro 9), así como la distribución genotípica (cuadro 10). Se encontró que este polimorfismo también se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Cuadro 9. Distribución alélica de *EPXH1 HYL*2* en indígenas tepehuanos por sexo.

<i>ALELOS DE EPXH1 HYL*2</i>	HOMBRES TEPEHUANOS n=36	IC (95%)	MUJERES TEPEHUANAS n=74	IC (95%)
<i>*1</i>	44.4	28.21-60.67	55.4	44.19-66.58
<i>HYL*2</i>	55.6	44.24-66.81	44.6	33.27-55.92

Los valores de los alelos están en %; IC (95%) Intervalos de confianza al 95%.

Cuadro 10. Distribución genotípica de *EPXH1 HYL*2* en indígenas tepehuanos por sexo.

GENOTIPOS DE EPXH1	HOMBRES TEPEHUANOS n=36	MUJERES TEPEHUANAS n=74	P HOMBRES	P MUJERES
<i>*1/*1</i>	n=8	n=21		
	He=22.2; Ho=19.7	He=28.3; Ho=30.7		
<i>*1/HYL*2</i>	n=16	n=40	0.9207	0.9252
	He=44.4; Ho=49.3	He=54.1; Ho=49.4		
<i>HYL*2/HYL*2</i>	n=12	n=13		
	He=33.4; Ho=31.0	He=17.6; Ho=19.9		

Los valores de los genotipos están en H(%). Heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad observada (Ho) y prueba del Equilibrio de Hardy-Weinberg.

VIII.2.2. DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.

La recombinación alélica y el subsecuente desequilibrio en las proporciones fenotípicas mendelianas esperadas en un cruzamiento génico no pudo determinarse para los alelos de *CYP1A1*2C* y *CYP1A1*4*, así como de *EPXH1 HYL*2* y *EPXH1 HYL*3* debido a la ausencia total de los polimorfismos *CYP1A1*4* y *EPXH1 HYL*3* en la población tepehuana estudiada. Por otro lado, se corroboró que para el caso de los genotipos de *CYP2D6*4* y *CYP2D6*10* no son independientes uno del otro, como ya se ha reportado con anterioridad en la literatura.

VIII.3. Evaluación de los niveles urinarios de 1-hidroxipireno (1-OHP)

El nivel de la media geométrica del 1-OHP urinario obtenido de 32 individuos Tepehuanos fue de 0.278 $\mu\text{mol/mol}$ creatinina, el cual es 6.55 veces más alto que el límite permisible reportado por NHANES (2009) (0.0425 $\mu\text{mol/mol}$ creatinina). Por equivalencia, se muestra el valor de la media geométrica en ng/g de creatinina que excede en 6.44 veces el límite permitido, (537.56 ng/g creatinina en Tepehuanos comparado con el valor medio de 83.4 ng/g creatinina reportado por NHANES 2009), (cuadro 11).

Cuadro 11. Niveles urinarios de 1-OHP en Tepehuanos en $\mu\text{mol/mol}$ creatinina y ng/g creatinina

Media geométrica $\mu\text{mol/mol}$ creatinina		Media geométrica ng/g creatinina	
Tepehuanos Presente estudio	NHANES 4th report, 2009	Tepehuanos Presente estudio	NHANES 4th report, 2009
0.278	0.0425	537.56	83.4

Debido a que los individuos Tepehuanos están expuestos al humo de la quema de biomasa en diferentes grados (cuadro 11), se procedió a dicotomizar los valores en exposición alta y normal de acuerdo al primer nivel de la guía Benchmark propuesta por Jongeneelen en el 2001. Este valor base de excreción urinaria de 1-OHP de 0.24mmol/mol creatinina representa lo excretado en individuos no fumadores y no ocupacionalmente expuestos a mezclas de hidrocarburos. En términos generales los niveles de 1-OHP en Tepehuanos están por encima del primer nivel de exposición permisible propuesto por esta guía (Jongeneelen 2001). Cabe destacar que el hábito tabáquico no influyó de manera significativa en los niveles urinarios de 1-OHP, ya que de los 32 tepehuanos evaluados, sólo uno de ellos, del sexo masculino, reportó fumar 2 cajetillas de cigarrillos al día y lo ha hecho por aproximadamente 14 años. Por lo que se corrobora que en estos individuos, de manera

generalizada, la quema de biomasa es la principal fuente de exposición de HAPs.

Al realizar un análisis por género dentro de la etnia tepehuana, como se muestra en el cuadro 12, no se observaron diferencias significativas en los niveles de 1-OHP ($p < 0.05$).

Cuadro 12. NIVELES URINARIOS DE 1-OHP DE INDÍGENAS TEPEHUANOS EXPUESTOS AL HUMO DE LA QUEMA DE BIOMASA.

MEDICIÓN		MEDIA		D EST.	PERCENTIL			REFERENCIA BENCHMARK GUIDELINE
DE 1-OHP URINARIO		GEOMÉTRICA			25	50	75	No fumadores
	GÉNERO	n						
$\mu\text{g/g}$ de	FEMENINO	21	0.5374	0.4259	0.3430	0.5243	0.9099	0.4632 $\mu\text{g/g}$ de creatinina equivalente a 0.24 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina
Creatinina	MASCULINO	11	0.5378	0.4239	0.3838	0.4518	1.0228	

Cabe destacar que si se dicotomizan los valores en ng/g de creatinina, tres cuartos de la población cae dentro de los límites normales de aceptación y un cuarto presenta niveles altos de 1-OHP. Si se extrapolan los resultados de gramos a moles se observa que hay correspondencia entre los resultados. En el cuadro mostrado a continuación se observan los niveles urinarios de 1-OHP en ng/g de creatinina por género del presente estudio (cuadro 13). Se puede observar que hay diferencias significativas en el grado de exposición tanto en hombres como en mujeres tepehuanos que exceden los valores reportados por el NHANES Survey para el género y la raza.

Cuadro 13. Hidroxipireno urinario (corregido por creatinina). Media geométrica y percentiles seleccionados de las concentraciones de orina (ng/g de creatinina) para la población Tepehuana por género del presente estudio.

PRESENTE ESTUDIO	AÑO	MEDIA GEOMÉTRICA (95% C.I.)	PERCENTILES SELECCIONADOS (95% C.I.)				TAMAÑO DE LA MUESTRA
GÉNERO			50AVO	75AVO	90AVO	90AVO	

FEMENINO	2010	537.4 (200.7-874.1)	524.3 (187.6-861.1)	909.9 (573.2-1246.6)	1235.6 (898.9-1572.3)	1789.4 (1452.7-2126.1)	21
MASCULINO	2010	537.8 (202.7-872.9)	451.8 (116.7-786.9)	1022.8 (687.7-1357.9)	1492.9 (1157.8-1828)	-----	11

Al relacionar los parámetros genéticos de los Tepehuanos con los niveles de 1-OHP urinario se observó que los 32 tepehuanos resultaron ser del tipo heterocigoto o doble mutante para *CYP1A1*2C*. Más del 50% de la población analizada para 1-OHP resultó ser doble mutante (G/G), (Cuadro 14).

En lo referente a *Epóxido hidrolasa microsomal (EPXH1)* se observó que la mayor parte de la etnia tepehuana expuesta presenta la condición genética heterocigota para el alelo lento del exón 3 o *HYL*2*. En el cuadro 14 se observa además que la condición ancestral se presenta en la más baja frecuencia.

Al comparar los resultados genotípicos de *GSTM1* con los niveles de exposición de 1-OHP en orina de indígenas tepehuanos se encontró que casi tres cuartos de la población expuesta presenta la delección del gen. Por lo que existen diferencias estadísticamente significativas entre la presencia y ausencia de *GSTM1* con los niveles urinarios de 1-OHP ($P < 0.05$). Más aún, no se observaron diferencias significativas entre el grupo con niveles altos y el grupo con niveles normales de 1-OHP en lo referente a la frecuencia de los alelos evaluados, con excepción del alelo *GSTM1*0*, el cual predominó en el grupo con niveles normales de 1-OHP (82.6%, $p = 0.013$) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Correspondencia entre *CYP1A1*2C*, *CYP2D6*2A*, *CYP3A4*1B*, *EPXH1* **HYL2* y *GSTM1* -/- con niveles urinarios de 1-OHP ($\mu\text{g/g}$ de creatinina) en indígenas tepehuanos de Durango.

GENOTIPOS	NIVELES DE 1-OHP EN $\mu\text{g/g}$ DE CREATININA					P-value
	ALTOS		NORMALES		TOTAL N	
	n	%	n	%		
<i>CYP1A1</i>						
*1A/*1A	0	0	0	0	0	0.844
*1A/*2C	4	33.3	8	66.7	12	

*2C/*2C	6	30.0	14	70.0	20	
CYP2D6						
*1/*1	6	35.0	11	64.7	17	0.818
*1/*2A	2	50.0	2	50.0	4	
*2A/*2A	1	50.0	1	50.0	2	
CYP3A4						
*1/*1	9	40.9	13	59.1	22	0.609
*1/*1B	0	0	1	100	1	
*1B/*1B	0	0	0	0	0	
EPXH1						
*1/*1	1	25.0	3	75.0	4	
*1/*HYL2	7	36.8	12	63.2	19	0.708
*HYL2/*HYL2	2	22.2	7	77.8	9	
*1/*HYL3	0	0	0	0	0	
*HYL3/*HYL3	0	0	0	0	0	
GSTM1						
GSTM1+/, +/-	3	33.3	6	66.7	9	0.013
GSTM1 -/-	4	17.4	19	82.6	23	

P<0.05 para tablas de contingencia, al aplicar la prueba de X².

VIII.4. Análisis de asociación entre variables antropométricas, bioquímicas y genéticas con los niveles urinarios de 1-OHP.

VIII.4.1. PRUEBA DE LA CHI CUADRADA (χ^2).

Los análisis de la variable antropométrica sexo con la variable genética de *epóxido hidrolasa HYL *2* arrojaron los siguientes resultados que resultaron significativos. De un total de 91 individuos evaluados, 60 son mujeres. De éstas, 19 resultaron ser T/T (poseedoras del genotipo silvestre o ancestral); 35 son T/C (heterocigotas), y 7 son C/C (doble mutante). Es decir que el 20.9% de las mujeres tepehuanas evaluadas presentan el genotipo silvestre T/T. En Cambio, el 38.5% de estas mujeres presentan la forma heterocigota del gen y el 7.7% restante presenta la forma doble mutante.

De los 91 individuos evaluados, 30 son varones. Se encontraron 6 hombres con el genotipo silvestre, 14 con la variante heterocigota y 10 con la forma doble mutante. Es decir que el 6.6% de la muestra evaluada fueron hombres con el genotipo silvestre (T/T); 15.4% con la forma heterocigota (T/C), y el 11% presentó la variante doble mutante.

Del análisis de los valores extremos se pudo observar que los valores absolutos más altos se ubicaron en hombres con la forma doble mutante. Para las otras dos variantes se mantuvo la proporción mayoritaria en mujeres. Sin embargo, se puede inferir que existe cierta asociación entre el sexo masculino y la forma doble mutante C/C, ya que el valor del estadístico de la Chi cuadrada fue de 6.481 y la razón de verosimilitud (likelihood ratio) fue de 6.159. Dichos valores difieren significativamente de 0 para niveles de significación superiores a 0.039 y 0.049, respectivamente; $p < 0.05$.

VIII.4.1.1. COEFICIENTES Φ PHI DE PEARSON Y V DE CRAMER.

En cuanto a las medidas simétricas basadas en el estadístico de la Chi cuadrada, los coeficientes Phi de Pearson y V de Cramer tuvieron valores iguales a 0.267 y se emplearon para medir el grado de asociación entre variables. Ambos coeficientes presentaron un nivel de significancia crítica igual a 0.039, lo que implica la existencia de una asociación moderadamente débil entre las variables sexo y *EPXH1 HYL *2*; más específicamente entre el sexo masculino y la variante doble mutante de *EPXH1 HYL *2* (Figura 8).

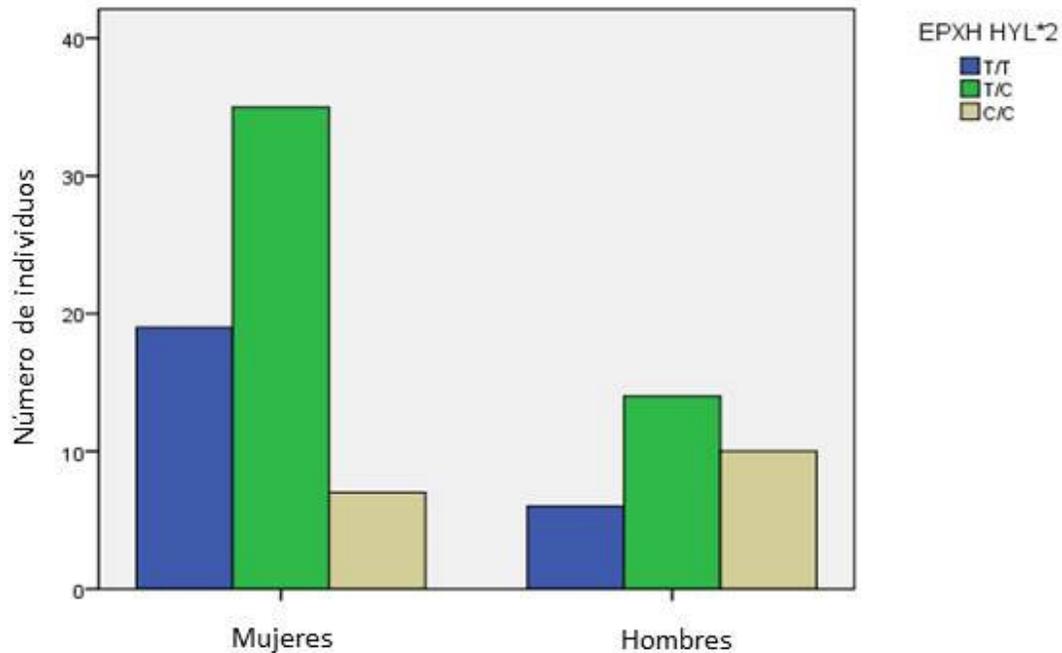


Fig. 8. Distribución de *EPXH1 HYL*2* en mujeres y hombres tepehuanos.

En la figura anterior se puede observar el mismo patrón entre mujeres y hombres para las variantes silvestre y heterocigota de *EPXH1 HYL*2*; en cambio, la única diferencia que se puede observar radica en una mayor cantidad de individuos del género masculino que poseen la variante doble mutante de *EPXH1 HYL*2*.

VIII.4.2. CORRELACIÓN DE SPEARMAN.

Para ver la intensidad de la relación existente entre las variables cuantitativas continuas con distribución normal (variables antropométricas) se realizó una correlación de Pearson. No obstante, para el análisis de variables discretas o continuas pero sin distribución normal (variables genéticas, algunas variables antropométricas y bioquímicas) se llevó a cabo una correlación de Spearman. Se escogió esta última para evaluar las asociaciones ya que la mayoría de las variables resultaron ajustarse mejor a modelos no paramétricos. De los valores arrojados por el coeficiente Rho de Spearman se observaron 9 asociaciones significativas; de las cuales, las más estrechamente correlacionadas fueron el género y la altura, seguidas del género y creatinina (Cuadro 15). En este mismo cuadro se observa que el género y *EPXH1 HYL*2* resultaron estar inversamente correlacionados. Dicho resultado significativo ($p=0.032$) confirma los hallazgos encontrados con la prueba de la Chi cuadrada.

Cuadro 15. Correlaciones no paramétricas significativas entre variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de indígenas tepehuanos.

VARIABLE ANTROPOMÉTRICA /GENÉTICA	VARIABLE BIOQUÍMICA/GENÉTICA	RHO DE SPEARMAN	P
EDAD	IMC	0.232	0.027*
GÉNERO	<i>EPXH1 HYL *2</i>	0.225	0.032*
GÉNERO	MASA CORPORAL	0.453	0.000*
GÉNERO	ALTURA	0.758	0.000*
IMC	COLESTEROL	0.452	0.000*
IMC	TRIGLICÉRIDOS	0.361	0.000*
GÉNERO	CREATININA	0.476	0.000*
<i>EPXH1 HYL *2</i>	CREATININA	0.235	0.000*
EDAD	TRIGLICÉRIDOS	0.225	0.031*

*p<0.05 estadísticamente significativa para la correlación de Spearman.

VIII.5. Análisis multivariado entre variables antropométricas, bioquímicas y genéticas con los niveles urinarios de 1-OHP en indígenas tepehuanos de Durango.

***ANÁLISIS MULTIVARIADO**

VIII.5.1. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN CANÓNICA.

Se empleó un análisis de correlación canónica (ACC) para comprobar si una serie de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de indígenas tepehuanos de Durango y sus valores urinarios de 1-OHP podrían ser indicadores de la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPS) a partir de la quema de biomasa y predecir de manera general, su susceptibilidad a padecer enfermedades relacionadas con esta quema. Se tiene un grupo de variables que proporciona información acerca de posibles

enfermedades relacionadas con la quema de biomasa; entre ellas están las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas. El otro conjunto de variables incluye a los valores urinarios de 1-OHP que son una medida indirecta del grado de exposición a HAPS y algunas variables antropométricas, bioquímicas y genéticas que también podrían estar involucradas con este tipo de exposición. A continuación se muestran los resultados de este análisis de correlación canónica (cuadro 16).

Cuadro 16. Resumen del análisis de correlación canónica en indígenas tepehuanos de Durango.

Análisis canónico, R canónica: 0.88213 Chi²(30)=48.470 p=0.01785

	Grupo izquierdo	Grupo derecho
No. de variables	6	5
Varianza extraída	84.0184%	100.000%
Redundancia total	28.1015%	38.5638%
Variables: 1	IMC	EDAD
2	CREATININA	GÉNERO
3	TRIGLICÉRIDOS	ENZIMA AST
4	ENZIMA ALT	<i>EPXH1</i>
5	1-OHP	<i>GSTM1</i>
6	<i>CYP1A1*2C</i>	

Como se puede observar en el cuadro anterior, sólo se observa una correlación canónica significativa. La correlación canónica (R) es de 0.88 con una significancia de 0.017 al tomar como base la prueba de la X². También se muestran los grupos de variables construidas para dicho análisis y el porcentaje de varianza explicada por cada conjunto así como la redundancia total de cada grupo. Por lo tanto, podría decirse que las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas empleadas podrían predecir enfermedades relacionadas con la quema de biomasa cuyo grado de exposición indirecto viene determinado por los valores urinarios de 1-OHP y otras variables antropométricas, bioquímicas y genéticas. A continuación se detallan tales afirmaciones.

A partir de los autovalores (eigenvalues) de las raíces o variables canónicas obtenidas de este análisis, se obtuvo que el autovalor más alto fue el de la primera raíz con un valor de 0.778. En el cuadro 17 se muestran las correlaciones entre pares de variables analizadas.

Cuadro 17. Correlaciones entre conjuntos de variables para el análisis de correlación canónica en indígenas tepehuanos de Durango.

Correlaciones entre el conjunto izquierdo con el conjunto derecho					
	EDAD	GÉNERO	AST	EPXH1	GSTM1
IMC	0.098937	-0.000080	0.163113	-0.009431	-0.151864
CREATININA	-0.210554	-0.258199	-0.200000	0.252050	0.040996
TRIGLICÉRIDOS	0.184087	-0.218218	-0.169031	0.118345	-0.034648
ALT	-0.215381	-0.174078	0.674200	0.169932	-0.469872
1-OHP	-0.272647	-0.204124	0.158114	-0.000000	-0.518563
CYP1A1*2C	0.301813	0.248452	0.115470	-0.242536	0.071007

En el cuadro anterior se muestran las correlaciones entre pares de variables de ambos grupos (X y Y). Ninguna correlación resultó ser mayor a 0.7 pero si resaltaron más de un par de correlaciones superiores a 0.4. Tal fue el caso de los valores de ALT y AST que mostraron una correlación directa de 0.67. Se presentó una correlación inversa de -0.51 entre los valores urinarios de 1-OHP y *GSTM1*. La otra correlación inversa de -0.46 se dio entre los valores de ALT y *GSTM1*. En la siguiente figura se muestra el número de raíces canónicas obtenidas.

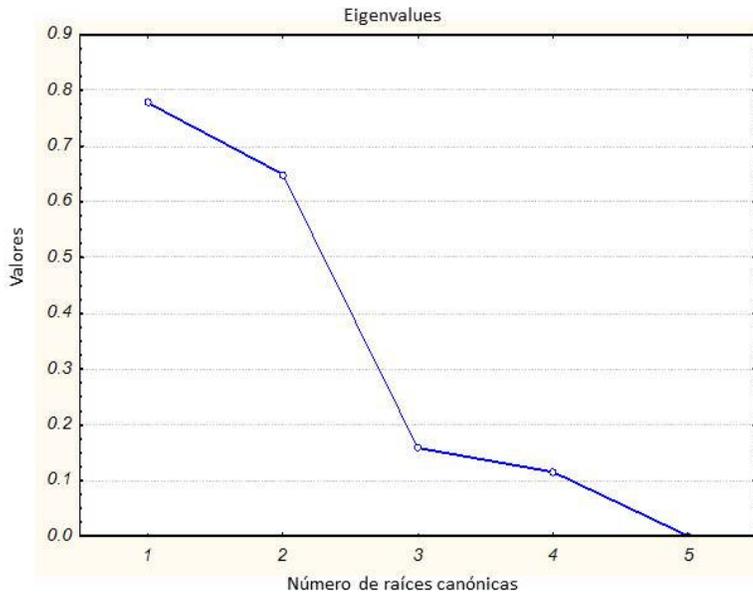


Fig. 9. Raíces o variables canónicas obtenidas a partir de las variables analizadas en indígenas tepehuanos de Durango.

De la figura anterior y del cuadro 18 se puede ver el autovalor de la primera raíz canónica y la contribución de cada variable al peso total de la raíz.

Cuadro 18. Pesos canónicos para el conjunto derecho de variables de indígenas tepehuanos de Durango.

Pesos canónicos, conjunto derecho					
	Root 1	Root 2	Root 3	Root 4	Root 5
EDAD	-0.051621	-0.425118	0.785459	0.685684	0.088684
GÉNERO	-0.505550	-0.482190	-0.489587	-0.127347	0.610807
ENZIMA AST	0.365746	-0.738655	0.348727	-0.489063	-0.203914
EPXH1	0.269885	0.498514	0.624343	-0.338026	0.584457
GSTM1	-0.525419	0.363975	0.371616	-0.823000	-0.341342

En el cuadro anterior se pudieron observar los coeficientes en la primera raíz que corresponden a las variables normalizadas para poder compararlas entre ellas (juego de variables de las Y). A partir de los valores absolutos se pudo obtener la contribución de cada variable a la variable canónica. Por lo que las

variables de mayor peso en la primera correlación canónica (Root 1) fueron *GSTM1* y el género.

En cuanto al juego de variables de las X se observó que la mayor contribución a la correlación canónica estuvo dada por los valores de la enzima ALT, en primer lugar; los valores urinarios de 1-OHP y más alejado, en tercer lugar, por los valores de creatinina. Estos resultados se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 19. Pesos canónicos para el conjunto izquierdo de variables de indígenas tepehuanos de Durango.

Pesos canónicos, conjunto izquierdo					
	Root 1	Root 2	Root 3	Root 4	Root 5
IMC	0.152267	-0.196483	0.101065	0.184312	0.900256
CREATININA	0.447401	0.615639	0.151606	-0.141612	-0.160942
TRIGLICÉRIDOS	0.245438	0.344665	0.685044	0.562884	-0.219701
ENZIMA ALT	0.724798	-0.448302	0.392655	-0.361997	-0.201346
1-OHP	0.610320	0.236240	-0.670450	0.493971	-0.134952
<i>CYP1A1*2C</i>	-0.262471	-0.520685	0.210226	0.238908	-0.536944

En el caso de los pesos canónicos, los coeficientes obtenidos representan a las variables normalizadas para ser comparadas, cuadros 18 y 19.

A continuación se muestran las raíces canónicas evaluadas con la prueba de X^2 . Se muestran los valores de R y R^2 , así como los valores de lambda (λ).

Cuadro 20. Evaluación de las raíces canónicas con la X^2 de datos de indígenas tepehuanos de Durango.

Test de la Chi-cuadrada con raíces sucesivas removidas						
	Canonicl	Canonicl	Chi-cuadr.	g l	p	Lambda(λ)
0	0.882135	0.778161	48.46973	30	0.017852	0.057777
1	0.806091	0.649782	22.87103	20	0.295258	0.260447

2	0.398354	0.158686	5.03463	12	0.956799	0.743673
3	0.339695	0.115393	2.09719	6	0.910540	0.883942
4	0.027424	0.000752	0.01279	2	0.993625	0.999248

Como se muestra en el cuadro anterior, se pudo comprobar que la primera correlación canónica fue la única significativa con un valor de $p=0.017$. La correlación canónica general fue buena, de 0.88. El valor de lambda (λ) fue adecuado ya que fue cercano a 0, lo que indicó que la distribución de las variables en ambos grupos fue correcta. Además, en la figura 10 se muestra la relación lineal entre los grupos de variables de la primera variable canónica.

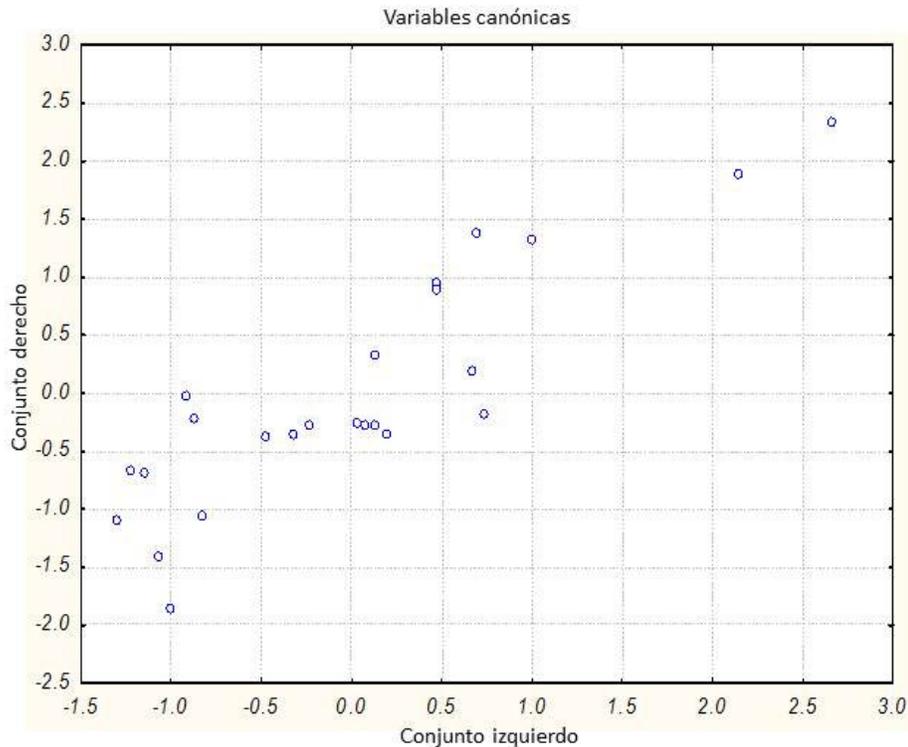


Fig. 10. Tendencia de los conjuntos de variables que conforman la primera correlación canónica.

A partir de los datos obtenidos de las variables canónicas que mejor contribuyeron a las correlaciones canónicas, se puede concluir que la

correlación para la exposición a hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPS) a partir de la quema de biomasa y la susceptibilidad a padecer enfermedades relacionadas con esta quema quedó determinada, en orden de importancia, por los valores de ALT y 1-OHP frente al género y a *GSTM1*. Cabe destacar que estos resultados tienen como deficiencia la baja correlación entre pares de variables.

VIII.5.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN CANÓNICA NO LINEAL (OVERALS).

Se planteó el uso de un Análisis de Correlación Canónica (ACC) con el fin de analizar y relacionar al mismo tiempo dos conjuntos de variables X y Y de este estudio y reducir la dimensión de la estructura del comportamiento de variables que influyeron significativamente sobre los valores urinarios de 1-OHP. Debido a que en el presente estudio se presentaron más de dos variables nominales se tuvo que llevar a cabo un análisis de correlación canónica no lineal (OVERALS) para la evaluación de los dos conjuntos de variables categóricas y sus correspondientes correlaciones. A través del escalamiento óptimo se analizaron múltiples conjuntos. Se definieron rangos de valores y escalas de medida para cada variable.

Por lo que, la eficacia del ajuste de la solución del análisis de correlación canónica no lineal a los datos antropométricos, bioquímicos y genéticos de los individuos tepehuanos evaluados con respecto a la asociación entre los dos conjuntos de variables que fusionaron a las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas fue de aproximadamente el 50%. Es decir que, los autovalores añadidos al ajuste total indican que el 53% del ajuste real de las variables evaluadas se explica mediante la primera dimensión. En tanto que, el 47% del mismo ajuste real se explica mediante la segunda dimensión. Más aún, para ambos conjuntos de variables se obtuvieron sus relaciones canónicas por dimensión. Se obtuvieron $\rho_1 = 0.754$ y $\rho_2 = 0.552$ para la dimensión 1 y la dimensión 2, respectivamente. Ambas correlaciones resultaron ser aceptables.

Del gráfico de saturaciones en componentes (component loadings) se pueden elucidar las correlaciones entre las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas que han sido cuantificadas y las puntuaciones de los objetos de los individuos tepehuanos.

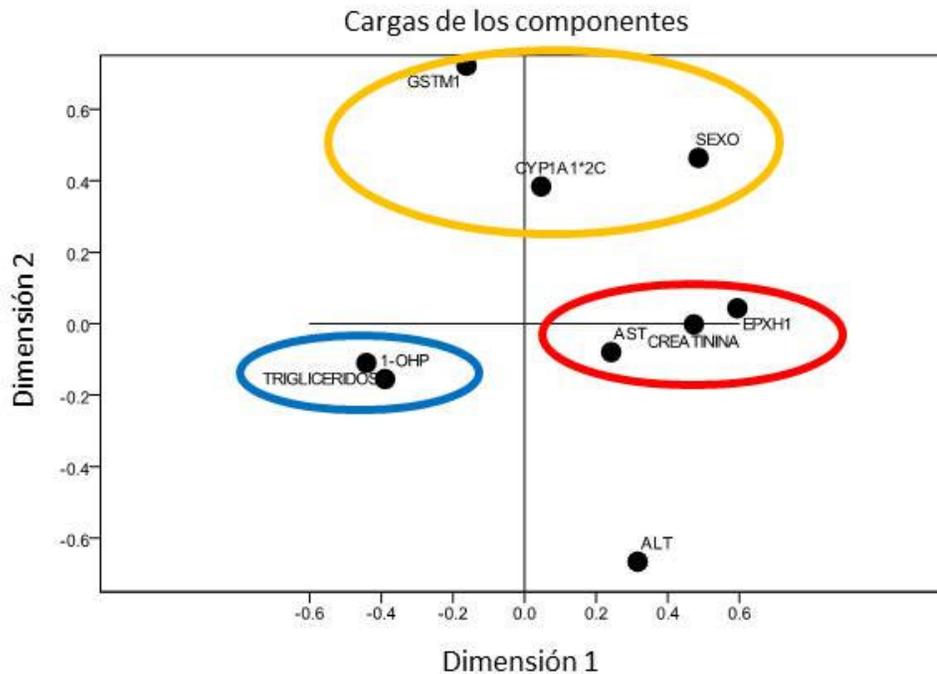


Figura 11. Puntuaciones y saturaciones de las variables en indígenas tepehuanos por dimensión.

Del gráfico anterior se pueden observar las relaciones aparentes entre las variables. Hay dos direcciones que no coinciden con los ejes horizontales y verticales. Una dirección se determina mediante el sexo, los valores urinarios de 1-OHP y los niveles de triglicéridos. En esa misma línea, *CYP1A1*2C* si coincide con el eje vertical. En la otra dirección se observan a *GSTM1* y a la enzima ALT. Sobre el eje horizontal se observan a la enzima AST, a la creatinina y a los polimorfismos de *EPXH1 HYL*2*. En cuanto a la cuantificación de variables por dimensión, se pudieron observar tres grupos muy definidos. Se pudo notar la contribución de cada variable al conjunto por dimensión. La variable que quedó más alejada de cualquier conjunto fue el de la enzima ALT. En el cuadrante superior derecho se pueden ubicar al sexo y al polimorfismo de *CYP1A1*2C* muy cercanos a *GSTM1*. Entre los cuadrantes superior e inferior derechos se agrupó a la enzima AST, a la creatinina y al polimorfismo de *EPXH1 HYL*2*. Finalmente, en el cuadrante inferior izquierdo se agrupó al 1-OHP con los triglicéridos.

A continuación se presenta el gráfico de los centroides etiquetados mediante los rangos de las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de los dos conjuntos obtenidos. Aquí se muestra, y se puede observar la eficacia con la que las variables separan a los grupos de objetos analizados.

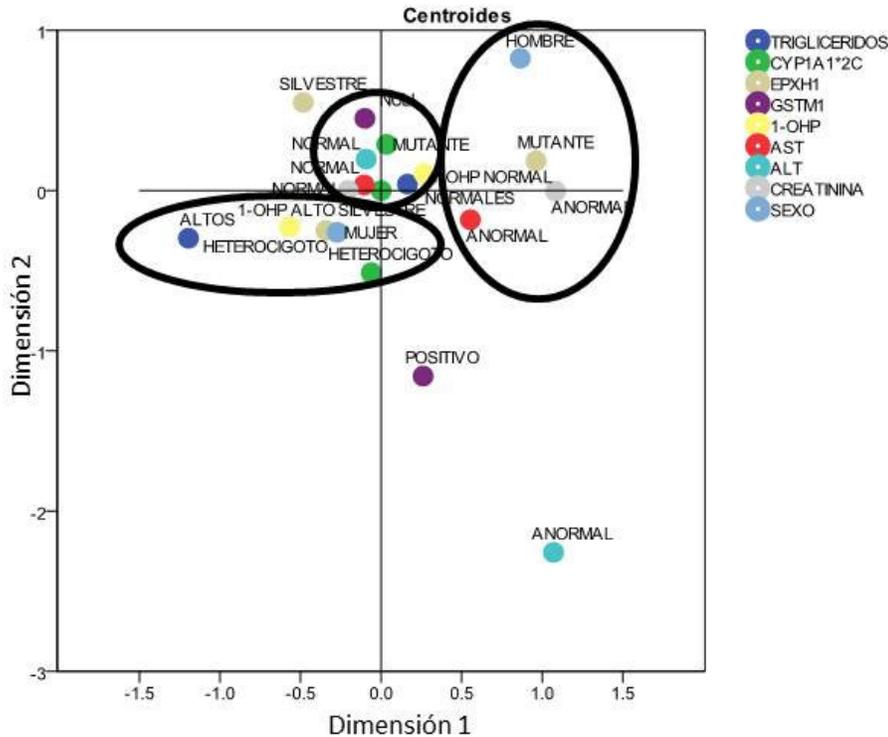


Figura 12. Análisis y agrupamiento por cuantificación de los centroides de los rangos de las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas entre hombres y mujeres tepehuanos.

Del agrupamiento de los casos por rangos de cada variable se pueden observar 3 grupos de pertenencia bien definidos. Sin embargo, el grupo del centro se podría subdividir en tres pequeños subgrupos. El grupo central más pequeño relaciona los valores normales de 1-OHP y niveles de triglicéridos normales. También relaciona a los valores normales de 1-OHP con *GSTM1* nulo y la variante doble mutante de *CYP1A1*2C*. El grupo ubicado inmediatamente a su izquierda agrupa a los valores normales de la enzima AST, creatinina y la variante silvestre de *CYP1A1*2C*. En cambio, el grupo ubicado encima del anterior, agrupa a los valores normales de la enzima ALT con la variante doble mutante de *CYP1A1*2C* y el alelo nulo de *GSTM1*. De los dos grandes grupos de los extremos se puede observar que el que está ubicado en el cuadrante superior derecho agrupa a los valores anormales de creatinina con el género masculino; mismo patrón que ya se había observado anteriormente en la correlación de Spearman y en el análisis de la Chi cuadrada. Además, también se agruparon a los niveles anormales de la enzima AST. Finalmente, el conjunto ubicado en el cuadrante inferior izquierdo relaciona claramente a las mujeres con la variante heterocigota de *EPXH1*

*HYL*2*, así como a la variante heterocigota de *CYP1A1*2C* con los valores anormales de 1-OHP y niveles altos de triglicéridos.

En cuanto a la cuantificación de variables por dimensión, se pudieron observar tres grupos muy definidos. Se pudo notar la contribución de cada variable al conjunto por dimensión. La variable que quedó más alejada de cualquier conjunto fue el de la enzima ALT. En el cuadrante superior derecho se pueden ubicar al sexo y al polimorfismo de *CYP1A1*2C* muy cercanos a *GSTM1*. Entre los cuadrantes superior e inferior derechos se agrupó a la enzima AST, a la creatinina y al polimorfismo de *EPXH1 HYL*2*. Finalmente, en el cuadrante inferior izquierdo se agrupó al 1-OHP con los triglicéridos, fig. 11.

VIII.5.3. Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis, PCA).

Se llevó a cabo un PCA para reducir los conjuntos de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de los indígenas tepehuanos en menos componentes o factores que nos ayuden a elucidar un patrón consistente. Por lo que el PCA se realizó con fines exploratorios.

Cabe resaltar que la medida de adecuación del muestreo de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) fue de 0.269 con una significancia de la prueba de esfericidad de Bartlett ($p=0.044$), en la que apenas se rechazó la hipótesis nula de la esfericidad y por consiguiente, indicó una pobre adecuación que se traduce en correlaciones bajas entre algunas de las variables evaluadas y la consiguiente eliminación de las variables redundantes. En el cuadro siguiente se puede observar la matriz de correlaciones que presenta el valor de 1.00 a lo largo de la diagonal y con valores críticos menores a 0.05 en algunas variables como AST, ALT y *GSTM1*. Más aún, *GSTM1* se correlacionó significativamente con la variable edad, la enzima ALT, los niveles urinarios de 1-OHP y el polimorfismo de *EPXH1*, cuadro 21.

Cuadro 21. Matriz de correlación entre variables evaluadas en indígenas tepehuanos de Durango.

Correlation Matrix ^{a,b}										
	AGE	BMI	CREATININ VALUES	TRIGLICERIDE LEVELS	ASTVALUES	ALTVALUES	1-OHP	CYP1A1*2C	EPXH1 HYL*2	GSTM1
Correlation	AGE	.251	-.179	-.246	-.210	-.198	-.241	.340	-.283	.417
	BMI	1.000	-.124	.178	-.012	.014	.135	.028	.165	-.259
	CREATININ VALUES	-.179	1.000	-.239	-.239	-.189	-.426	-.060	.382	.094
	TRIGLICERIDE LEVELS	.246	.178	1.000	-.200	-.158	-.051	.100	.200	.000
	ASTVALUES	-.210	-.012	-.239	1.000	.791	.255	.100	-.040	-.316
	ALTVALUES	-.198	.014	-.189	.791	1.000	.081	-.040	.253	-.500
	1-OHP	-.241	.135	-.426	-.051	.255	1.000	.255	.112	-.403
	CYP1A1*2C	.340	.028	-.060	.100	.100	-.040	1.000	-.280	.079
	EPXH1 HYL*2	-.283	.165	.382	.200	-.040	.253	.112	1.000	-.506
	GSTM1	.417	-.259	.094	.000	-.316	-.500	-.403	.079	1.000
Sig. (1-tailed)	AGE		.239	.163	.202	.216	.167	.084	.127	.043
	BMI		.158	.312	.240	.481	.297	.456	.257	.150
	CREATININ VALUES		.239	.312	.170	.170	.226	.039	.407	.355
	TRIGLICERIDE LEVELS		.163	.240	.170	.213	.265	.420	.346	.213
	ASTVALUES		.202	.481	.170	.213	.000	.154	.346	.437
	ALTVALUES		.216	.479	.226	.265	.000	.375	.438	.156
	1-OHP		.167	.297	.039	.420	.154	.375	.154	.329
	CYP1A1*2C		.084	.456	.407	.346	.438	.154	.130	.378
	EPXH1 HYL*2		.127	.257	.059	.213	.437	.156	.329	.130
	GSTM1		.043	.150	.355	.500	.101	.017	.049	.378

a. Only cases for which GENDER = WOMAN are used in the analysis phase.
b. Determinant = .008

Después de observar la matriz de correlación anterior, se pudieron resaltar algunas correlaciones bajas y moderadas tanto positivas como negativas. De las cuales, una correlación inversa moderada de -0.506 se observó entre los valores de *GSTM1* y *EPXH1*. Además, otra correlación inversa moderada de -0.426 se observó entre la creatinina y los niveles de 1-OHP. En cambio, AST mostró una correlación moderada positiva con ALT de 0.791. *GSTM1* mostró correlaciones inversas moderadas con ALT de -0.5 y los niveles urinarios de 1-OHP de -0.403. Además, *GSTM1* mostró también una correlación positiva moderada con la edad (0.417). Sin embargo, no se pudieron encontrar correlaciones significativas superiores a 0.8 entre ninguna de las variables evaluadas.

A continuación se muestran las comunalidades de las variables que conforman los componentes a extraer. Esta estimación se realiza calculando la correlación múltiple al cuadrado entre una determinada variable y las variables restantes incluidas en el análisis factorial. En el siguiente cuadro se muestran las comunalidades de las variables analizadas en tepehuanos.

Cuadro 22. Comunalidades de las variables analizadas en tepehuanos.

Comunalidades ^a		
	Inicial	Extracción
EDAD	1.000	.798
IMC	1.000	.546
CREATININA	1.000	.639

TRIGLICERIDOS	1.000	.553
AST	1.000	.874
ALT	1.000	.936
1-OHP	1.000	.892
CYP1A1*2C	1.000	.383
EPXH1 HYL*2	1.000	.822
GSTM1	1.000	.786

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

En lo referente a la extracción de los componentes principales se obtuvieron los correspondientes eigenvalues o autovalores que indican cuáles componentes agrupan a la mayor cantidad de varianza explicada, Cuadro 23.

Cuadro 23. Varianza total explicada por componente principal.

Component	Initial Eigenvalues			Extraction Sums of Squared Loadings			Rotation Sums of Squared Loadings		
	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %	Total	% of Variance	Cumulative %
1	2.650	26.498	26.498	2.650	26.498	26.498	2.045	20.455	20.455
2	1.899	18.994	45.492	1.899	18.994	45.492	1.920	19.201	39.656
3	1.580	15.801	61.292	1.580	15.801	61.292	1.712	17.123	56.779
4	1.100	10.997	72.289	1.100	10.997	72.289	1.551	15.510	72.289
5	.962	9.616	81.905						
6	.831	8.310	90.216						
7	.410	4.101	94.317						
8	.363	3.631	97.948						
9	.158	1.582	99.530						
10	.047	.470	100.000						

Extraction Method: Principal Component Analysis.

a. Only cases for which GENDER = WOMAN are used in the analysis phase.

Se obtuvieron 10 componentes y se observó que el primer componente explicó la mayor parte de la variación; ya que del primero al cuarto explicaron aproximadamente el 72% de la variación total, se decidió retener a los primeros 4 componentes principales.

Con el fin de confirmar visualmente la decisión de retención y desecho de componentes se analizó el "scree plot" o gráfico de sedimentación de los componentes versus eigenvalues, Figura 13.

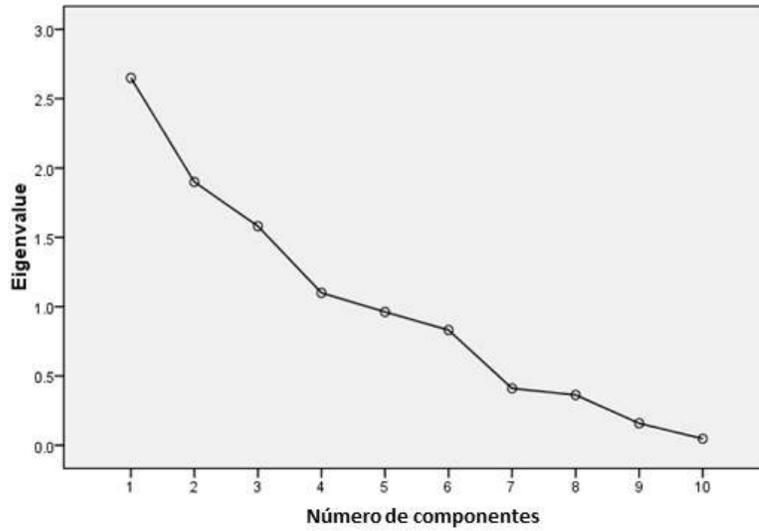


Fig. 13. Gráfico de sedimentación de los valores únicos o eigenvalues por componente del análisis de variables en indígenas tepehuanos.

De los 10 componentes extraídos y de los 4 retenidos, sólo los dos primeros muestran valores cercanos a 1 (cargas) de forma positiva o negativa como se puede corroborar en el cuadro siguiente.

Cuadro 24. Representación de las cargas de los 4 componentes analizados.

Matriz de componentes

	Componentes			
	1	2	3	4
EDAD	-.556	.499	.206	.445
IMC	.123	.246	.649	.220
CREATININA	-.184	-.765	-.037	.134
TRIGLICERIDOS	-.173	.218	.675	.141
AST	.710	.320	-.403	.324
ALT	.789	.115	-.222	.501
1-OHP	.502	.423	.152	-.663
CYP1A1*2C	-.130	.598	-.031	-.082
EPXH1 HYL*2	.454	-.546	.559	.079
GSTM1	-.813	.074	-.334	.087

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Con el proceso de rotación, se pretendió encontrar una estructura más simple (Thurstone, 1947); es decir, componentes que agrupasen mejor al conjunto de variables que explican mejor el comportamiento de éstas en el análisis de las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de los indígenas tepehuanos evaluados. Con tal fin, se llevó a cabo una rotación varimax como se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 25. Resultados del método de rotación varimax con normalización de Kaiser.

Matriz de componentes rotados^a

	Componente			
	1	2	3	4
EDAD	-.121	.505	.555	.470
IMC	.086	.014	-.095	.727
CREATININA	-.211	-.669	.324	-.203
TRIGLICERIDOS	-.194	.067	.024	.715
AST	.894	.174	-.140	-.160
ALT	.960	-.102	-.069	.006
1-OHP	.050	.302	-.893	.036
CYP1A1*2C	-.012	.606	-.057	.111
EPXH1 HYL*2	.117	-.769	-.271	.380
GSTM1	-.454	.350	.626	-.256

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Método de rotación: Varimax con normalización de Kaiser.

a. La rotación convergió en 7 iteraciones.

Los cuatro componentes o factores retenidos mostraron eigenvalues que explicaron poco más del 72% de la varianza. Se desglosaron por partes tres de los cuatro componentes con mayor variación. A continuación se muestran los diagramas obtenidos de los cuatro componentes retenidos empezando por el diagrama del componente principal 1 versus el del componente principal 2. En este, se muestra la distribución de los casos entre el factor 1 y factor 2. Ambos factores explican más del 54% de la varianza total explicada.

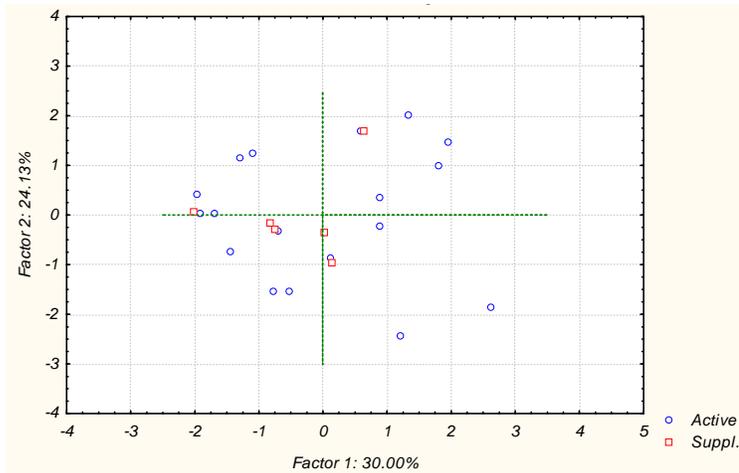


Fig. 14. Proyección de los casos de acuerdo al género en dos componentes principales (F1 y F2).

Una vez analizado el patrón de comportamiento de las variables analizadas en los indígenas tepehuanos, se escogió el comportamiento de la comparación entre los factores 1 y 2 ya que explicaron más del 54% de la variación total explicada (fig. 14). En el componente 1 se agruparon mejor los casos en la parte negativa del eje Y, en tanto que hubo un agrupamiento compacto en la parte negativa del eje X y uno un poco más disperso pero casi con el mismo número de casos en la parte positiva del eje X también.

Sin embargo, debido a la dispersión encontrada en el agrupamiento de los datos se decidió subdividir a las variables en activas (variantes genéticas y valores urinarios de 1-OHP); y suplementarias (variables antropométricas y bioquímicas) con el fin de analizar mejor los componentes extraídos en el sistema de coordenadas principales. Para cada variable analizada se hizo una representación gráfica en dos dimensiones; se colocaron las cargas del componente o factor 1 en el eje vertical y, las del componente 2 en el eje horizontal. Sin embargo, los conjuntos de variables se observaron dispersos en los cuatro cuadrantes como se muestra en la figura de la proyección de variables o coordenadas principales. Dentro del segundo componente, los valores de AST y 1-OHP fueron los más cercanos entre sí; otra cercanía se dio entre la edad y *GSTM1* en la parte positiva y negativa del segundo componente como se observa en la siguiente figura.

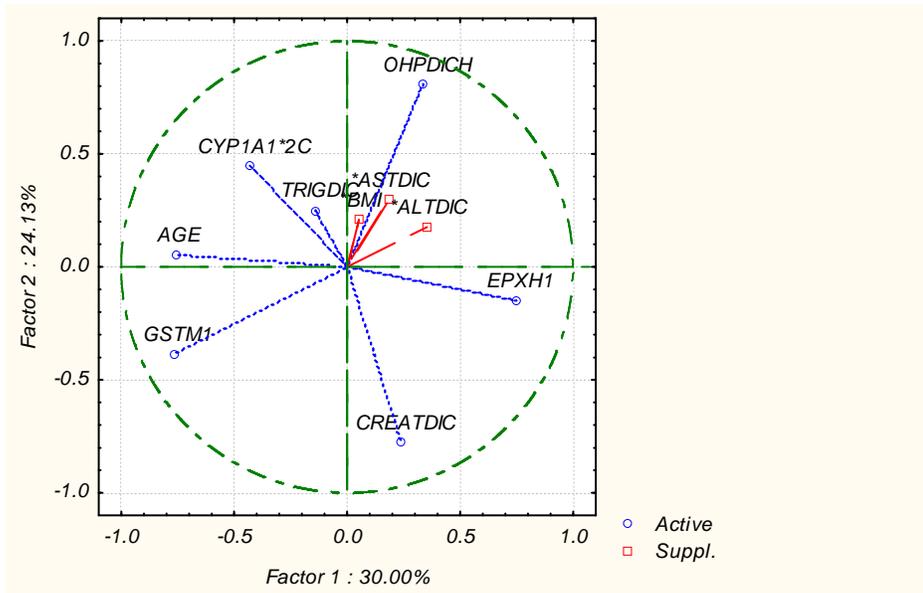


Fig. 15. Proyección de las variables activas y suplementarias analizadas en dos dimensiones (coordenadas principales).

De esta figura se puede observar que EPXH1 y creatinina se agrupan en la parte negativa inferior del factor 1 (eje Y) y la parte positiva del factor 2 (eje X). En cambio, *GSTM1* queda solo en las partes negativas de ambos componentes (1 y 2). La edad se acerca a *GSTM1* pero permanece en la frontera positiva del componente 2 (eje X). *CYP1A1*2C* y 1-OHP se separan del resto de las variables agrupadas en la parte superior del factor 2. Quedan muy juntas las variables de ALT, AST, IMC y triglicéridos. Sin embargo, en este sistema el conjunto de variables superior se hizo más grande con la inclusión de las variables ALT y AST.

Con el fin de reforzar los hallazgos encontrados en esta agrupación y una vez analizados los componentes, se recurrió a la interpretación de los componentes con rotación factorial. Enseguida se procedió a la rotación de los ejes para visualizar mejor los grupos de variables como se muestra en la siguiente figura tridimensional.

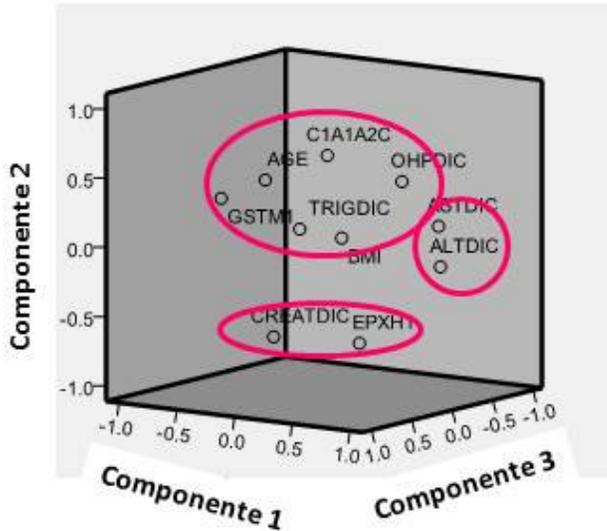


Fig. 16. Agrupamiento de las variables analizadas en tres componentes principales después de la rotación de los ejes.

Una vez rotados los ejes se pudo observar que dos grupos de variables permanecen bien definidos; tal es el caso de las variables creatinina y *EPXH1* en la parte inferior y negativa de los tres componentes. El otro bloque compacto está formado por las variables ALT y AST en la frontera negativa y positiva del componente 2 y positiva del componente 1. En tanto que, un grupo más grande y separado que se ubica en la parte negativa del componente 1 pero positiva del componente 2, está formado por las variables IMC, triglicéridos, *GSTM1*, edad, *CYP1A1*2C* y 1-OHP. Se empleó la rotación varimax normalizada como se muestra en la siguiente figura.

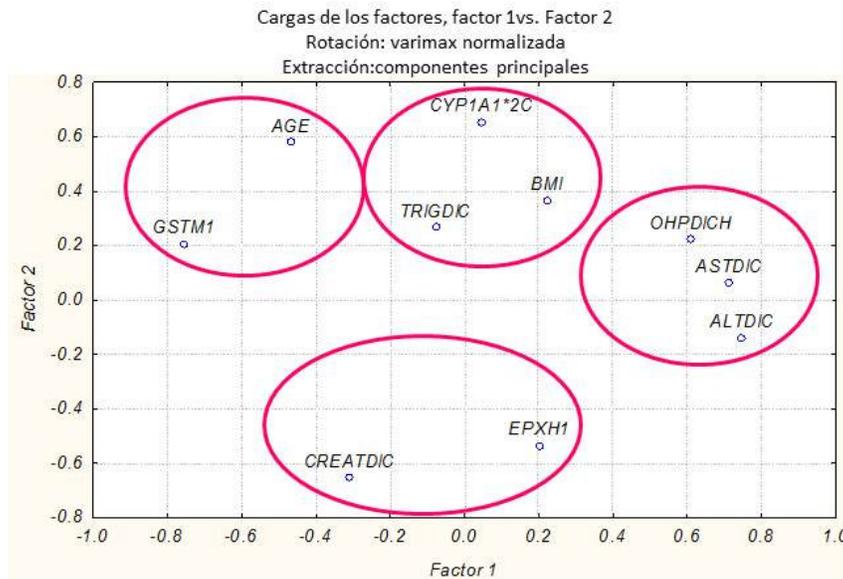


Fig. 17. Reubicación de las variables después de la rotación varimax normalizada.

Entre los dos factores se pueden observar 4 conjuntos de variables como se muestra en la figura 17, después de la rotación varimax normalizada. Uno de los grupos más compactos se observa entre valores positivos del factor 1 (eje y) y un ligero valor negativo del factor 2 (eje x) para los valores urinarios de 1-OHP y las enzimas AST y ALT. Un grupo que podría ser muy significativo por las implicaciones médicas reportadas en la literatura está conformado por *CYP1A1*2C*, triglicéridos y el IMC. Se sigue manteniendo la agrupación entre las variables creatinina y *EPXH1*. Y en el extremo superior izquierdo de la figura quedó *GSTM1* con la edad.

En el siguiente cuadro se muestran las comunalidades una vez realizada la extracción y la rotación varimax normalizada. Los valores moderadamente más altos de R^2 se observaron en las variables ALT, AST y *GSTM1*, respectivamente.

Cuadro 26. Comunalidades de los factores después de la rotación.

Comunalidades de la Extracción: Rotación de los componentes principales: Varimax normalizada

VARIABLE	F1	F2	Multiple R^2
AGE	0.216886	0.553601	0.439606
BMI	0.049251	0.182605	0.169915
CREATDIC	0.095925	0.521967	0.352351
TRIGDIC	0.006045	0.077602	0.151015
ASTDIC	0.507854	0.511866	0.617634
ALTDIC	0.558383	0.578010	0.653535
OHPDICH	0.372738	0.422808	0.482989
CYP1A1*2C	0.002152	0.431624	0.285745
EPXH1	0.041653	0.328750	0.251807
GSTM1	0.570014	0.612213	0.616591

Además, se muestra que una vez llevada a cabo la rotación, la varianza total realmente explicada fue menor al 50% como se observa en el siguiente cuadro.

Cuadro 27. Valores únicos después de la rotación.

Eigenvalues de la Extracción: Componentes principales				
	Eigenvalue	% Total	Acumulado	Acumulado
1	2.461947	24.61947	2.461947	24.61947
2	1.759099	17.59099	4.221047	42.21047

También se muestra el gráfico de sedimentación después de la rotación antes mencionada, fig 18. Se conservaron los mismos 10 componentes con el primer punto de inflexión en descenso después del tercer componente, pero la pendiente se observa más suavizada.

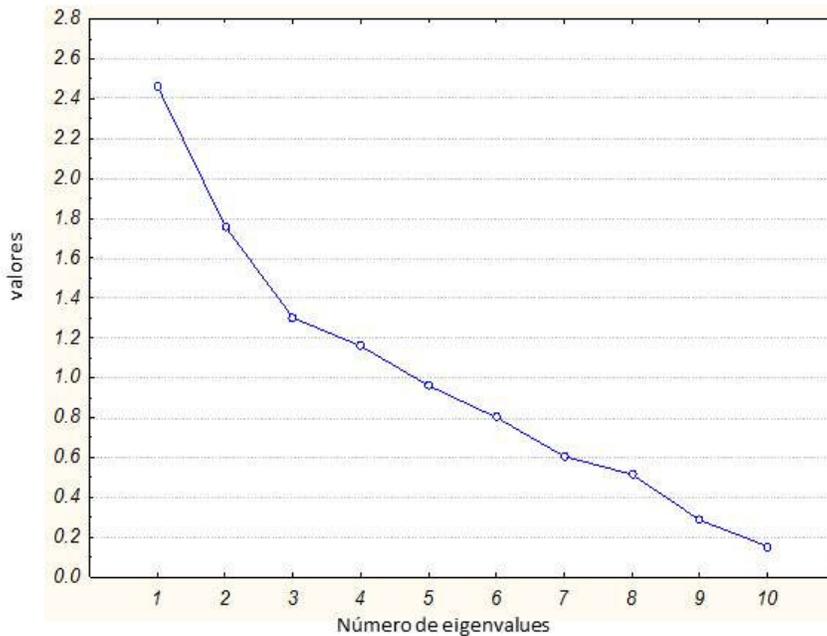


Fig. 18. Gráfico de sedimentación de los 10 componentes después de la rotación varimax.

Después de la presentación de los eigenvalues, se tomaron los coeficientes de los factores o componentes retenidos después de la rotación que fueron necesarios para elaborar las ecuaciones lineales capaces de explicar el comportamiento de los componentes nuevos. Por lo que de la matriz de coeficientes se obtuvieron las combinaciones de cada variable con sus

respectivos coeficientes para construir las dos ecuaciones lineales Y_1 y Y_2 que son la base de las puntuaciones factoriales.

$$Y_1 = 0.088EDAD + 0.059IMC + (-0.061CREATININA) + (-0.073TRIGLICÉRIDOS) + 0.473AST + 0.531ALT + (-0.177 * 1 - OHP) + (-0.008CYP1A1 * 2C) + 0.011EPXH1 + (-0.119GSTM1)$$

$$Y_2 = 0.220EDAD + (-0.014IMC) + (-0.364CREATININA) + 0.005TRIGLICÉRIDOS + 0.115AST + (-0.040ALT) + 0.204 * 1 - OHP + 0.318CYP1A1 * 2C + (-0.405EPXH1) + 0.158GSTM1$$

Con el fin de aclarar con qué variables se aglutinaron más casos, se analizaron de manera tridimensional las variables analizadas por componentes principales con los casos estudiados. En la siguiente figura se muestra el patrón encontrado.

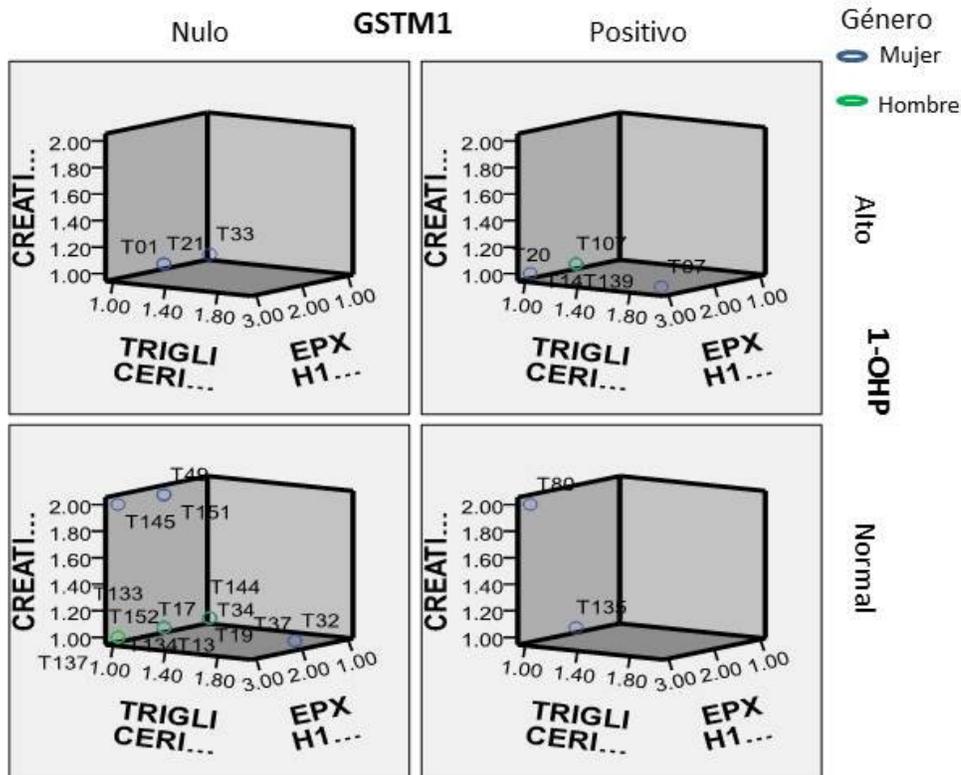


Fig. 19. Contraste de las variables bioquímicas y genéticas en indígenas tepehuanos evaluados con 1-OHP.

El mayor número de casos se encuentran en la parte inferior izquierda que corresponde a los valores normales de 1-OHP y *GSTM1* nulo. En este grupo, los individuos presentaron valores normales de triglicéridos y las variantes silvestre o heterocigota de *EPXH1* con valores normales de creatinina. El otro bloque mayoritario de casos se ubica en el extremo superior derecho, que corresponde a los niveles altos de 1-OHP, con la presencia de *GSTM1* y la variante doble mutante de *EPXH1*, con valores normales tanto de triglicéridos como de creatinina.

De igual modo, se recurrió al análisis de gráficos por matrices después de llevar a cabo el análisis de componentes principales con el que se obtuvieron los agrupamientos mostrados en la siguiente figura.

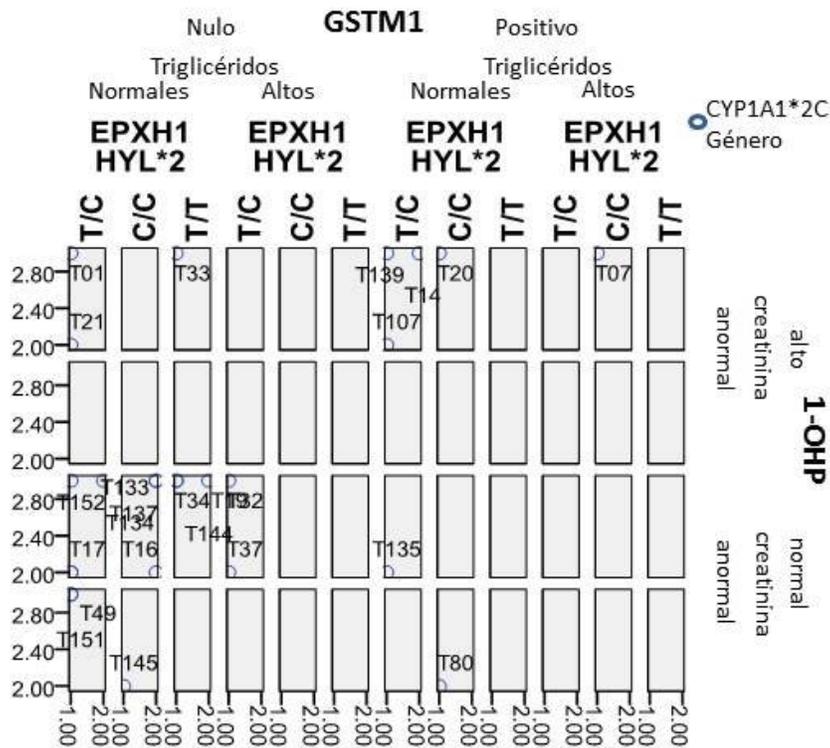


Fig. 20. Gráfico de comparación y contraste de las variables bioquímicas y genéticas analizadas por PCA en indígenas tepehuanos con 1-OHP.

En este tipo de gráfico por matrices se observa que la mayor cantidad de casos se sitúa con los valores normales de 1-OHP, con el genotipo nulo de *GSTM1*, con los portadores del genotipo doble mutante de *EPXH1* así como valores altos de triglicéridos y valores anormales de creatinina.

VIII.5.4. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES CATEGÓRICOS (CATPCA).

El análisis de componentes principales categórico (CATPCA) tiene como objetivo principal el análisis simultáneo de la cuantificación de las variables categóricas y la reducción de la dimensionalidad de los datos. Este análisis permite, por lo tanto, cuantificar de forma óptima a las variables categóricas en la dimensión adecuada. Más aún, permite el modelamiento de relaciones no lineales entre las variables de estudio.

Los resultados del procedimiento CATPCA permiten la generación de cuadros para las puntuaciones de los objetos, las saturaciones en componentes, el historial de iteraciones, las correlaciones de las variables originales y de las transformadas, la varianza explicada por variable y por dimensión; las cuantificaciones de las categorías para las variables seleccionadas y estadísticos descriptivos para esas variables seleccionadas.

En el siguiente cuadro se muestran las correlaciones de las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas transformadas analizadas por el procedimiento CATPCA en indígenas tepehuanos.

Cuadro 28. Correlaciones de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas para análisis CATPCA.

Correlations Transformed Variables											
	1-OHP	EPXH1	CYP1A1*2C	GSTM1	TRIGLICERIDES	CREATININ	AST	ALT	SEX	AGE	BMI
1-OHP	1.000	.051	.157	-.527	.011	-.299	.168	.114	-.185	-.303	.300
EPXH1	.051	1.000	-.321	-.294	.158	.220	-.055	.149	.047	-.243	-.085
CYP1A1*2C	.157	-.321	1.000	.089	.021	-.127	.100	-.086	.226	.478	.219
GSTM1	-.527	-.294	.089	1.000	-.044	.029	-.214	-.473	.142	.368	-.303
TRIGLICERIDES	.011	.158	.021	-.044	1.000	-.161	-.161	-.109	-.208	.202	.038
CREATININ	-.299	.220	-.127	.029	-.161	1.000	-.190	-.129	-.245	-.177	-.249
AST	.168	-.055	.100	-.214	-.161	-.190	1.000	.676	.010	-.212	.100
ALT	.114	.149	-.086	-.473	-.109	-.129	.676	1.000	-.166	-.240	.031
SEX ^a	-.185	.047	.226	.142	-.208	-.245	.010	-.166	1.000	.318	.071
AGE ^{a,.b}	-.303	-.243	.478	.368	.202	-.177	-.212	-.240	.318	1.000	.164
BMI ^{a,.b}	.300	-.085	.219	-.303	.038	-.249	.100	.031	.071	.164	1.000
Dimension	1	2	3	4	5	6	7	8			
Eigenvalue ^c	3.252	2.214	1.338	1.130	.935	.536	.402	.193			

a. Supplementary variable.
 b. Missing values were imputed with the mode of the quantified variable.
 c. Eigenvalues of correlation matrix weighted with variable weights and excluding supplementary variables.

Del cuadro anterior, las correlaciones positivas más altas registradas en este análisis de 0.676 se dan entre las variables ALT y AST. Una correlación positiva moderada de 0.478 se da entre las variables CYP1A1*2C y la edad; otra positiva moderada de .368 se observa entre GSTM1 y la edad así como de 0.220 entre creatinina y EPXH1. Una correlación inversa moderada de -0.527 se da entre GSTM1 Y los valores urinarios de 1-OHP. Otra inversa

moderada de -0.473 se da entre *GSTM1* y ALT. Además, las dos primeras dimensiones presentan los eigenvalues más altos; de 3.252 y 2.214 respectivamente. Los porcentajes de varianza total explicada por estos dos conjuntos de variables fue de 32.6% y 22.2% para las dimensiones 1 y 2 respectivamente. Ambas dimensiones explicaron el 54.8% de la varianza total.

Una vez que se obtuvieron los autovalores ponderados por los pesos de cada variable analizada resultante de la matriz de correlaciones transformadas, se consiguieron las respectivas puntuaciones de los objetos; es decir, de los casos representativos de los indígenas tepehuanos evaluados. Por lo que a continuación se muestra una gráfica de los puntos de los objetos bajo estudio en las dos dimensiones principales, fig. 21.

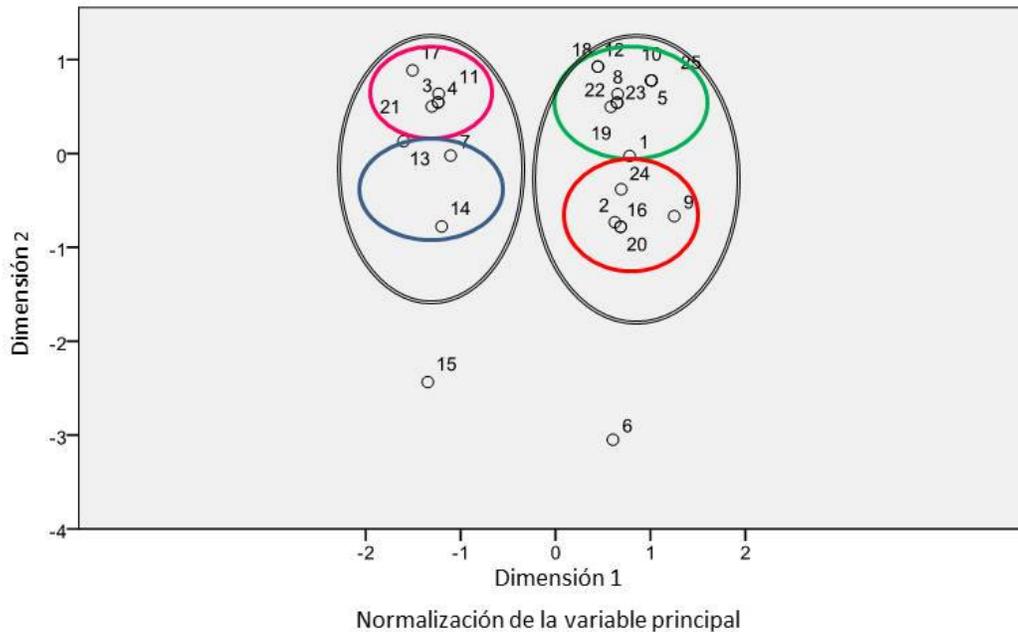


Fig. 21. Distribución bidimensional de los puntos de los objetos etiquetados por el número de cada caso (indígena tepehuano evaluado).

Después de observar la distribución de los puntos de los objetos etiquetados por el número de cada caso; específicamente, por la etiqueta de cada individuo tepehuano, se pueden inferir algunos conjuntos de variables-casos muy importantes. En la dimensión 1 se puede observar que un gran conjunto de datos se ubica en la parte negativa, en tanto que, el otro grupo de objetos se sitúa en la parte positiva. El número 15, es el único caso ubicado en la parte negativa de ambas dimensiones. Mientras que sólo los casos 6 y 15 se

ubican en la parte negativa de la dimensión 2. Exceptuando estos dos casos, todos los casos estudiados se ubican en la parte positiva de la dimensión 2. A su vez, estos dos grandes grupos se pueden subdividir en grupos más pequeños de acuerdo a la cercanía de los casos entre ellos como se muestra en la figura anterior.

A continuación se muestra la distribución de los casos y variables de acuerdo a las cargas que conforman cada componente. Dichas cargas se muestran con una línea partiendo del origen hasta el punto donde se ubica cada variable.

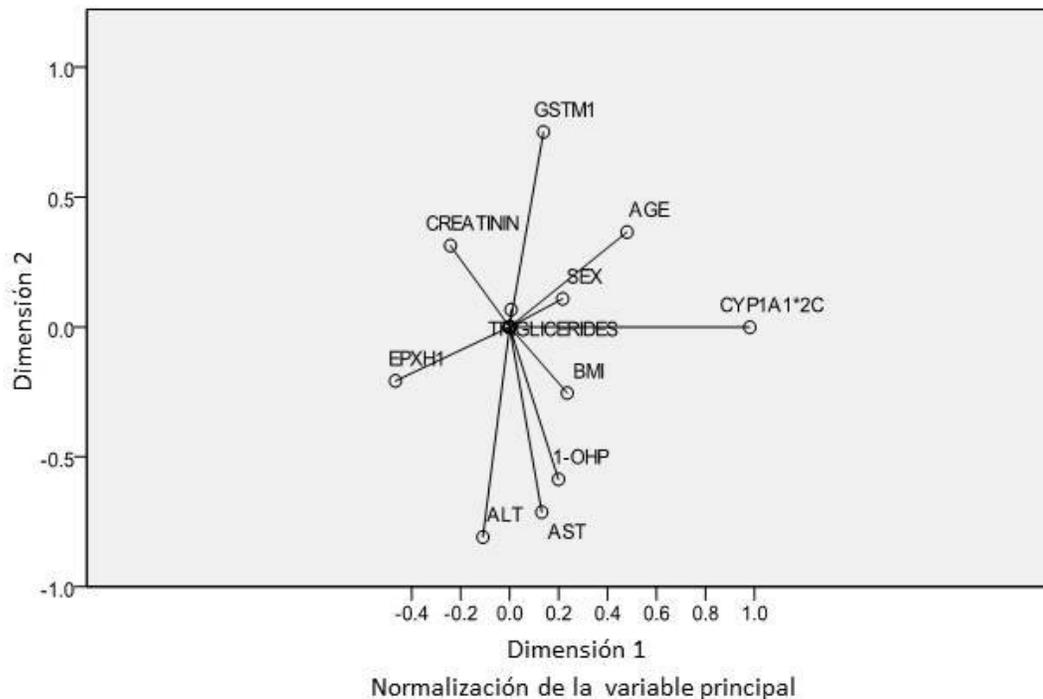


Fig. 22. Cargas de los componentes de las variables evaluadas en indígenas tepehuanos.

Al partir del origen como se observa en la figura anterior, las variables más relacionadas entre ellas son los triglicéridos, el IMC y el género. A continuación, más alejada del origen, se observa otra agrupación con una relación inversa entre la creatinina y *EPXH1 HYL *2*, en la parte negativa de la dimensión 2. Un tercer grupo más alejado del origen está conformado por *GSTM1*, *CYP1A1*2C* y la edad en extremos positivos de ambas dimensiones. En tanto que, un cuarto grupo compuesto por las variables ALT, AST y 1-OHP se ubica en la parte negativa de la dimensión 2 y la parte positiva de la

dimensión 1, a excepción de la variable ALT que se ubica en la frontera de su parte negativa.

Pero, al analizar los centroides de las variables en su ubicación espacial junto con su proyección, se pueden observar los siguientes patrones. En la parte positiva de la dimensión 1 se encuentra *CYP1A1*2C*, esta parte corresponde al polimorfismo doble mutante *G/G* y su correspondiente proyección en la parte negativa, estaría dada por su variante heterocigota *A/G*. Respecto a *GSTM1* la presencia de *GSTM1* está en la parte positiva de la dimensión 1. Su correspondiente proyección en la parte negativa de la dimensión 1 corresponde a *GSTM1* nulo. En cuanto a *EPXH1 HYL*2* ubicado en la parte negativa de la dimensión 1 que corresponde a su variante heterocigota *T/C*, su proyección en la parte positiva de la dimensión 1 se refiere a la variante doble mutante *C/C*. La variable creatinina ubicada en la parte negativa de la dimensión 1 tiene su proyección en la parte positiva de la dimensión 1 y corresponde a los valores anormales de creatinina. El sexo ubicado en la parte positiva de la dimensión 1 corresponde al género masculino, en tanto que su proyección en la parte negativa de la dimensión 1 corresponde al género femenino. En cuanto a los niveles urinarios de 1-OHP, sus valores normales están ubicados en la parte positiva de la dimensión 1 y su correspondiente proyección ubicada en la parte negativa de la dimensión 1 integra a los valores altos o anormales de 1-OHP.

Finalmente, en la siguiente figura es posible apreciar la distribución bidimensional de las variables y los casos que mejor encajan en cada una de ellas. En esta gráfica biespacial, los puntos de los objetos (casos) se representan a partir de la selección realizada en las coordenadas de las variables (antropométricas, bioquímicas y genéticas) como saturaciones en componentes o centroides de las variables.

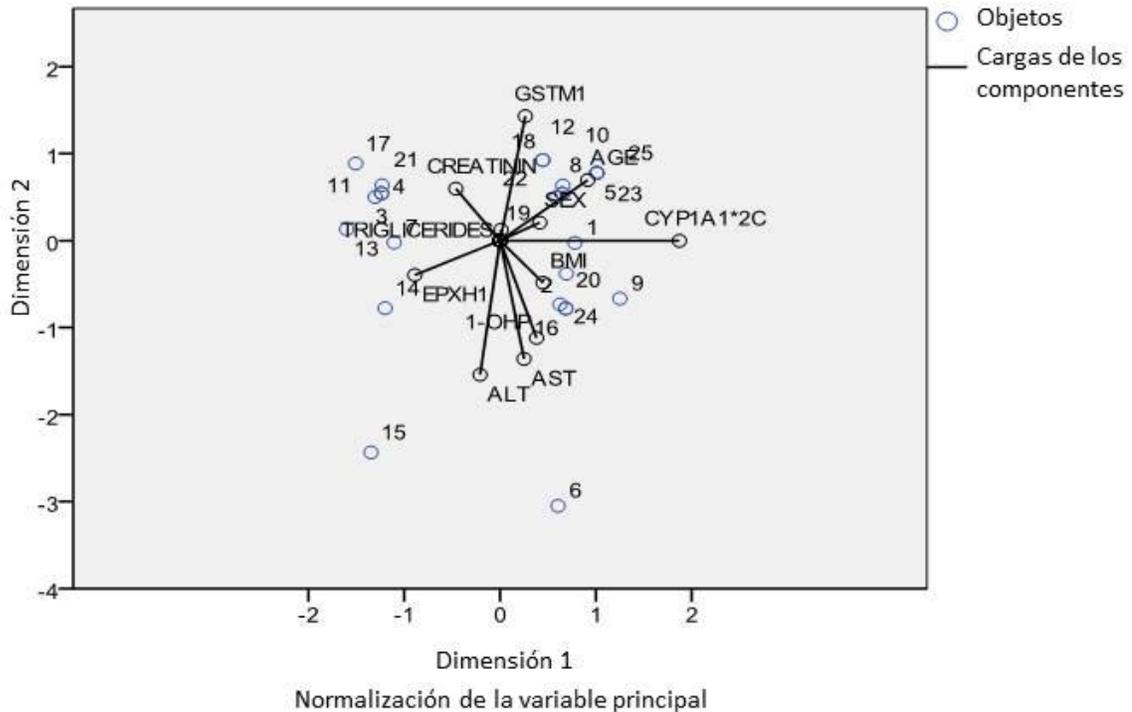


Fig. 23. Representación biespacial de variables y casos asociados a ellas a partir de datos de indígenas tepehuanos.

En la figura 23 se pueden observar las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de hombres y mujeres tepehuanos evaluados por el procedimiento de componentes principales categórico. A excepción de los casos aberrantes 6 y 15, el resto de los casos se ubican en las regiones positivas y negativas de ambas dimensiones. Por ejemplo, los casos 3, 4, 7, 11, 13, 17 y 21 se ubican en la región negativa de la dimensión 1 pero en la región positiva de la dimensión 2 y están más cercanos a las variables triglicéridos, creatinina y *EPXH1 HYL*2*. Por lo tanto, se puede inferir que este conjunto de casos comparten valores similares de creatinina, niveles parecidos de triglicéridos y genotipo similar de *EPXH1 HYL*2*. De igual forma, como se ha corroborado en otros análisis multivariados, las enzimas ALT y AST se agrupan con los valores urinarios de 1-OHP; los casos 2, 9, 16, 20 y 24 asociados a este grupo se ubican en la parte positiva de la dimensión 2 y la parte negativa de la dimensión 1. Y finalmente, el grupo conformado por el género, el IMC, la edad, *GSTM1* y *CYP1A1*2C* aglutina a los casos 1, 5, 8, 10, 12, 18, 19, 22, 23 y 25 ubicados en las regiones positivas de las dimensiones 1 y 2.

Al analizar más detenidamente esta figura, los casos 3, 4, 7, 11, 13, 17 y 21 parecen tener niveles de triglicéridos anormales, valores normales de creatinina y poseer la variante heterocigota T/C de *EPXH1 HYL*2*. Los casos

2, 9, 16, 20 y 24 se agrupan cerca de las enzimas ALT y AST, así como del 1-OHP. Lo que significa que estos individuos tepehuanos parecen tener valores anormales de las enzimas ALT y AST pero presentan valores normales del 1-OHP urinario. Finalmente, los casos 1, 5, 8, 10, 12, 18, 19, 22, 23 y 25 están cerca de las variables género, *CYP1A1*2C* y *GSTM1*. De forma específica, estos individuos parecen ser mayoritariamente hombres de IMC normal, menores de 50 años que poseen el genotipo nulo de *GSTM1* y la variante doble mutante G/G de *CYP1A1*2C*.

VIII.5.5. Análisis de agrupamiento jerárquico (Hierarchical Cluster Analysis).

Se llevó a cabo un análisis de similitud por conglomerados (cluster) por el método de Ward y la medida de distancia City-block (Manhattan). Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Con este análisis de agrupamiento se encontraron similitudes entre las diferentes variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de los diferentes individuos tepehuanos evaluados. En la siguiente figura se distinguen 4 grupos; dos agrupamientos principales de mayor tamaño y dos que agrupan a un menor número de individuos.

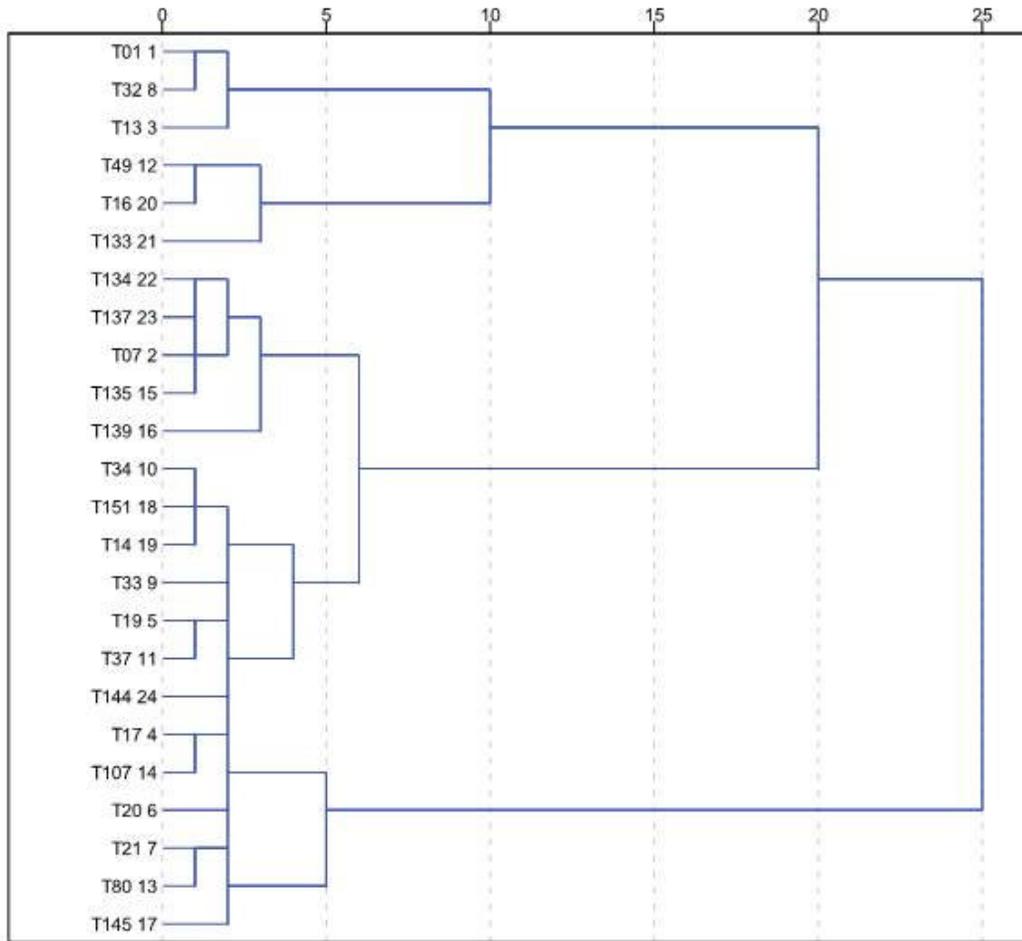


Fig. 24. Dendrograma jerárquico de similitud entre indígenas tepehuanos. Resultados de la técnica de conglomerados por el método de Ward.

En la figura 24 se pueden observar los siguientes agrupamientos. Se formaron dos grandes grupos troncales. El primero tiene dos grandes ramas que a su vez se subdividen en otras dos ramas más pequeñas, en cuyas hojas se pueden encontrar a los casos del uno al veintiuno. En cambio, el segundo tronco está compuesto por dos ramales en cuyas hojas se encuentran la mayoría de los objetos que incluyen a los casos 2 al 22 en la rama más pequeña; y los casos 4 al 24 en la última y más grande rama.

El primer grupo conformado por T01, T13 Y T32 presenta a mujeres con edades e IMC similares. Tienen valores de creatinina, AST y ALT normales. Una presenta la variante doble mutante de *CYP1A1*2C* y dos, la variante heterocigota; las tres mujeres poseen la variante heterocigota de *EPXH1 HYL*2* y la delección de *GSTM1*. Sólo dos mujeres presentan valores normales de 1-OHP urinario.

En el segundo grupo T16, T49 y T133 son una mujer y dos hombres con IMC similares bajos. La mujer presenta valores anormales de creatinina y los dos varones tienen valores normales de creatinina. Los tres individuos tienen valores de triglicéridos, AST y ALT normales. Sólo un hombre y una mujer presentan la variante doble mutante de *CYP1A1*2C*; Sólo la mujer tiene la variante heterocigota de *EPXH1* y los dos hombres presentan la variante doble mutante de *EPXH1*, además de que los tres individuos presentan la delección de *GSTM1*. Los tres individuos presentan valores normales del 1-OHP urinario.

En el tercer grupo T07, T134, T135, T137 y T139 son tres mujeres y dos hombres que presentan valores normales de creatinina. Tienen niveles anormales de VLDL. Dos mujeres presentan valores altos de 1-OHP y sólo una presenta valores normales. Los dos hombres presentan valores normales de 1-OHP, la variante doble mutante de *CYP1A1*2C* y los dos presentan la delección de *GSTM1*.

El cuarto grupo, que es el más extenso y diferente del resto de los otros tres, está formado por T14, T17, T19, T20, T21, T33, T34, T37, T80, T144, T145 Y T151 de los cuales 9 casos son mujeres y 2 hombres. Sus edades oscilan entre los 20 y 40 años de edad. Las mujeres presentan valores normales y anormales de todas las pruebas bioquímicas. Solamente los hombres presentan valores normales de creatinina, triglicéridos, AST y ALT. Tres individuos, dos mujeres y un hombre, presentan niveles altos de 1-OHP; el resto de los 7 individuos presenta valores normales. Tres individuos presentan la forma heterocigota de *CYP1A1*2C* y siete la forma doble mutante. Además, cuatro individuos, tres mujeres y un hombre, presentan la forma silvestre de *EPXH1*; cuatro individuos presentan la forma heterocigota de *EPXH1* y tres mujeres presentan la forma doble mutante de *EPXH1*. Dos mujeres y un hombre presentan *GSTM1* positivo. Los siete individuos restantes presentan *GSTM1* nulo.

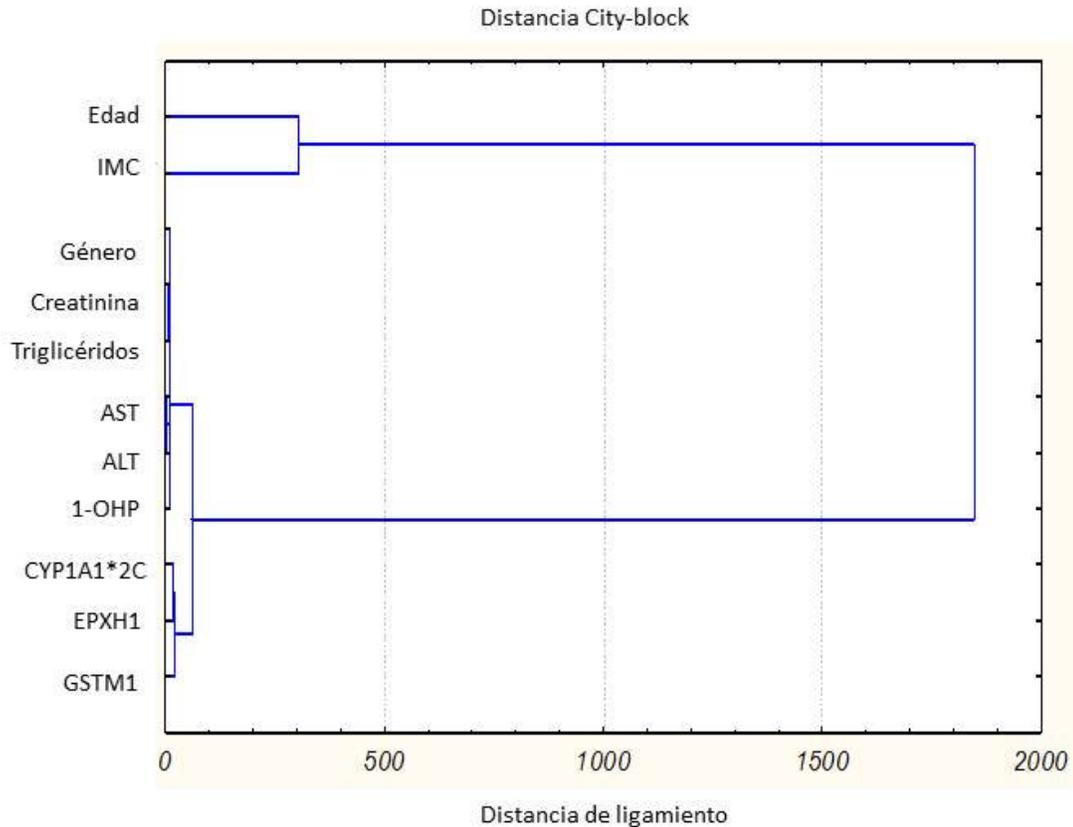


Fig. 25. Dendrograma de similitud de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas evaluadas en indígenas tepehuanos por el método de Ward.

Dos grandes grupos troncales se pueden observar en la figura anterior. El primero se subdivide sólo en las variables edad e índice de masa corporal. El segundo grupo se subdivide a su vez en otros dos grupos o ramas más pequeños. Uno integra a 6 variables y el otro, sólo a tres variables. Las 6 variables incluyen al género, los niveles de creatinina, triglicéridos, las enzimas hepáticas AST y ALT, y los niveles urinarios de 1-OHP. El otro conjunto de hojas está formado por las variantes genéticas de *CYP1A1*2C*, *EPXH1* *HYL*2* y *GSTM1*. Cabe destacar que el segundo subgrupo troncal de tres variables está mejor representado por los polimorfismos genéticos anteriormente mencionados.

Ya que el análisis por conglomerados permite la obtención de un número óptimo de grupos partiendo de la similitud entre los casos, después de llevar a cabo el análisis de agrupamiento jerárquico se procedió a la verificación por el método no jerárquico de K medias que necesita con antelación el número de conglomerados que se desea obtener por lo que este método proporciona una

solución final única para el número de conglomerados preestablecido. Para este análisis se propuso la obtención de dos conglomerados. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) se muestran en el cuadro siguiente. Por lo que el tamaño relativo del estadístico F de Fisher brinda información concerniente a la contribución de cada variable para la separación de grupos.

Cuadro 29. ANOVA procedente del análisis de K medias en indígenas tepehuanos.

ANOVA						
	Cluster		Error		F	Sig.
	Media al cuad	GL	Media al cuad	GL		
EDAD	1598.521	1	42.310	22	37.781	.000
GÉNERO	.188	1	.196	22	.957	.339
IMC	6.021	1	10.465	22	.575	.456
CREATININA	.021	1	.151	22	.138	.713
TRIGLICÉRIDOS	.000	1	.119	22	.000	1.000
AST	.333	1	.136	22	2.444	.132
ALT	.083	1	.080	22	1.048	.317
1-OHP	.521	1	.219	22	2.381	.137
CYP1A1*2C	.188	1	.247	22	.759	.393
EPXH1 HYL*2	.188	1	.474	22	.395	.536
GSTM1	1.021	1	.179	22	5.704	.026

Del análisis de varianza ANOVA mostrado en el cuadro anterior, se obtuvo que la mayor diferencia entre agrupamientos de casos es debida a las variables GSTM1 y la edad de los individuos tepehuanos evaluados (Cuadro 29).

VIII.6. Redes neuronales (Neural Networks).

Las redes neuronales artificiales permiten analizar una gran cantidad de información emulando el funcionamiento de una red neuronal biológica. Su aplicación matemática es muy importante en el mundo de las ciencias para explicar fenómenos que por otras técnicas estadísticas resultan poco confiables. Debido a lo anterior, se decidió evaluar la influencia del conjunto de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de los indígenas tepehuanos y sus mediciones urinarias de 1-OHP por medio de redes neuronales con el modelo de perceptrón multicapa.

A continuación se muestra el análisis que resultó más adecuado con base en la partición del entrenamiento, prueba y reserva. La función de activación de la capa oculta fue la sigmoïdal, así como la función identidad fue la empleada como la función de activación de la capa de salida, fig.26.

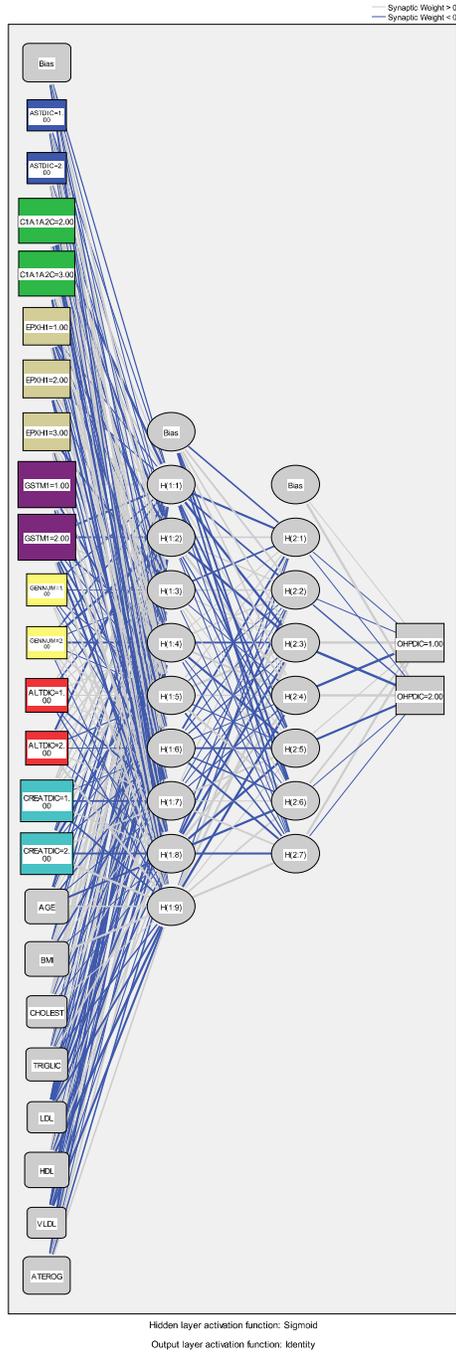


Fig. 26. Representación de la red neuronal empleada para analizar las variables antropométricas, bioquímicas y genéticas de indígenas tepehuanos con sus niveles urinarios de 1-OHP.

Resumen del modelo

Entrenamiento	Suma de cuadrados del error	.169
	Porcentaje incorrecto Predicciones	.0%
	Regla de parado empleado	1 paso consecutivo sin decremento en el error
	Tiempo de entrenamiento	0:00:00.000
	Prueba	
Prueba	Suma de cuadrados del error	.317
	Porcentaje incorrecto Predicciones	.0%
Reserva	Porcentaje incorrecto Predicciones	20.0%

Variable dependiente: HIDROXIPIRENO

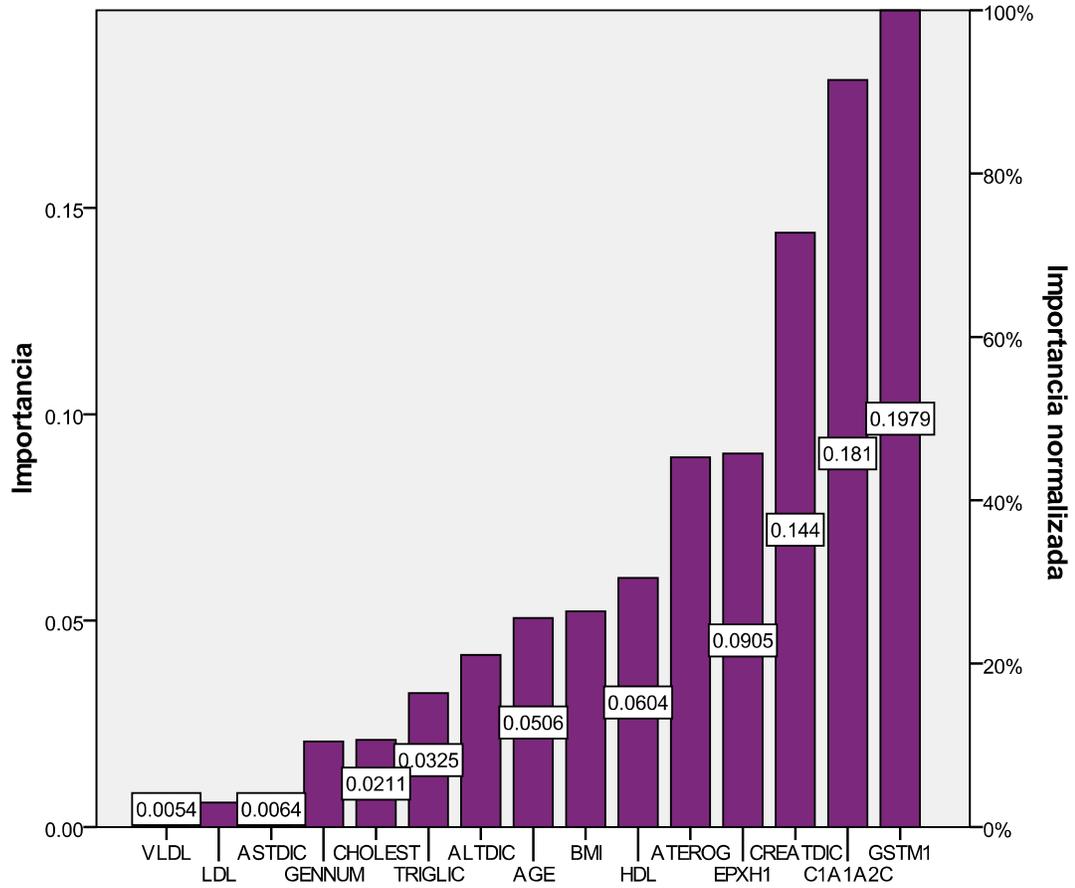


Fig. 27. Histograma de la red neuronal escogida.

La red neuronal anterior tuvo una partición de 50% para entrenamiento, 25% de prueba y 25% de reserva. Se pudo comprobar que la variable con más influencia sobre los valores urinarios de 1-OHP fue *GSTM1* seguida de *CYP1A1*2C*, creatinina y *EPXH1*, fig.27.

VIII.7. Regresión logística (Logistic Regression).

Con el fin de estimar la contribución de los diferentes factores sobre la ocurrencia del evento; es decir, corroborar la posible relación entre los niveles urinarios de 1-OHP con el conjunto de variables antropométricas, bioquímicas y genéticas, se llevó a cabo una regresión logística. El modelo logístico multivariado empleado en general, se muestra a continuación (figura 28).

Figura 28. MODELO LOGÍSTICO MULTIVARIADO Y SUS VARIABLES.

Y= Nivel crítico/no crítico de exposición al 1-OHP

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8 + \beta_9 X_9 + \beta_{10} X_{10})}}$$

VARIABLES DEL MODELO LOGÍSTICO MULTIVARIADO

$\beta_1 X_1$ = Polimorfismos de *CYP1A1*2C*

$\beta_2 X_2$ = Polimorfismos de *CYP2D6*2A*

$\beta_3 X_3$ = Polimorfismos de *CYP3A4*1B*

$\beta_4 X_4$ = Polimorfismos de *EPXH1 HYL*2*

$\beta_5 X_5$ = Polimorfismos de *GSTM1*

$\beta_6 X_6$ = valores de 1-OHP

$\beta_7 X_7$ = Alcohol si/no

$\beta_8 X_8$ = fumador si/no

$\beta_9 X_9$ = pruebas antropométricas

$\beta_{10} X_{10}$ = pruebas bioquímicas

Con las variables mostradas se llevaron a cabo varias regresiones logísticas con diferentes métodos en los que se incluyó el de pasos hacia adelante, pasos hacia atrás y la combinación de ambos o “stepwise”; así como el de “enter” o de entrada automática. Con el método “enter” se obtuvieron los siguientes resultados. Se clasificó adecuadamente al 79.2% de los datos. La única variable que permaneció dentro del modelo y que resultó estar relacionada con los valores urinarios de 1-OHP fue *GSTM1* con su variante positiva ($p=0.04$). *GSTM1* nulo quedó fuera del modelo. El error estándar de β para *GSTM1* positivo mostró IC95% de 1.024-93.070 con un exponente $\beta = 9.762$. Lo que significó que los individuos tepehuanos tuvieron un riesgo de más de 9 veces más de presentar niveles urinarios altos de 1-OHP con la variante positiva de *GSTM1*.

Del coeficiente de determinación R cuadrado de Cox y Snell utilizado para explicar la proporción de la varianza de la variable dependiente 1-OHP explicada por las variables predictoras mostradas en la figura anterior, se obtuvo que el 23.7% de la variación de la variable dependiente es explicada por la variable incluida en el modelo. El modelo logístico ajustado con la constante, *GSTM1*, edad y niveles de triglicéridos quedó de la siguiente manera,

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-(0.731 + 2.279X_1 - 0.021X_2 - 0.033X_3)}}$$

Se obtuvieron, también, datos acerca del polimorfismo de *EPXH1 HYL*2* en hombres y mujeres tepehuanos en relación a sus niveles urinarios altos de 1-OHP. Quise establecer la posible relación de este polimorfismo con los valores urinarios altos de 1-OHP que mostró una tabla de clasificación del 76.9%. La estimación del riesgo relativo en tepehuanos con la variante heterocigota de *EPXH1 HYL*2* de tener valores urinarios altos de 1-OHP fue de 10.632 veces más que en individuos tepehuanos con las variantes homocigotas silvestre y doble mutante ($p=0.014$, con IC95% 1.615-70.0526).

Esta estimación se ajustó por la variante heterocigota del gen *EPXH1 HYL*2*, la variante doble mutante de *EPXH1 HYL*2*, el IMC, la edad, el género, niveles de colesterol, y por *GSTM1*. Por lo que el modelo logístico final quedó como a continuación se muestra,

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-(1.050 + 2.364X_1 + 1.120X_2 + 0.035X_3 + 0.136X_4 - 0.023X_5 - 0.002X_6 - 1.068X_7)}}$$

IX. DISCUSIÓN

En este estudio se observó que en indígenas Tepehuanos la presencia del gen *GSTM1*, además de *CYP1A1*2C*, los niveles de creatinina, y *EPXH1 HYL*2* se asociaron con niveles altos del 1-OHP urinario, el cual es un biomarcador indirecto de exposición a PAHs. Estos niveles se encontraron 6.5 veces por encima del estándar del NHANES 2009 compilado por el CDC. Por el contrario, la delección de *GSTM1* se asoció con niveles normales de 1-OHP urinario, tal como lo indican los análisis de correlación, de agrupamiento y de regresión logística, además del de redes neuronales.

La incidencia de enfermedades respiratorias en población mestiza mexicana del municipio del Mezquital, Durango, México es de aproximadamente 78,000 por cada 100,000 habitantes (SSD, 2013). En el caso de los indígenas Tepehuanos de Durango, las estadísticas sobre el estado clínico y nutricional, además de la incidencia de diferentes tipos de cáncer son escasas y poco confiables debido, entre otros factores, a la dificultad para acceder a sus comunidades. Los pocos datos que existen son producto de la evaluación de Tepehuanos residentes en comunidades relativamente grandes y de fácil acceso, con el inconveniente de que en ellos se presenta cierto grado de transculturización y de mestizaje (Rodríguez-Morán et al. 2008; INEGI 2010; y SSD, 2013). De acuerdo a un estudio del Centro de Cancerología de Durango, la escasa población indígena que ha llegado a tratarse algún tumor maligno se ha archivado dentro de la población general, sin diferenciar el término indígena (Lares et al. 2010). Considerando lo antes mencionado, se procedió a establecer un perfil antropométrico, bioquímico y genético en una comunidad de los Tepehuanos del sur del Mezquital, Durango.

La actividad de las enzimas que metabolizan tóxicos ambientales (HAPs) es dependiente, entre otros factores, de los polimorfismos genéticos, como se describen para el gen *CYP1A1* (Guengerich and Shimada, 1991; Kawajiri et al. 1993; Cascorbi et al. 1996; Shimada et al. 1996; Nebert, 2000; Shimada and Fujii-Kuriyama, 2004; Harrigan et al. 2004), cuyas frecuencias varían entre grupos étnicos. Hace dos décadas se describió una frecuencia alta de la variante alélica *CYP1A1*2C* (0.44) en individuos México-americanos que representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades mediadas por exposición, especialmente en fumadores ocasionales (Ishibe et al. 1997). Este mismo polimorfismo fue hallado con una frecuencia de 0.54 en una muestra de población mestiza mexicana (Pérez-Morales et al. 2008, 2011), la cual es cercana a la frecuencia de los Tepehuanos de este estudio (0.65). Se han descrito frecuencias mayores de *CYP1A1*2C* que las obtenidas en poblaciones mexicanas en indígenas sudamericanos como los

Xavantes (0.97), guaraníes (0.902) y achés (1.0) (Gaspar et al. 2002). Por otro lado, la frecuencia reportada en individuos caucásicos y africanos es muy baja (0.05 y 0.03, respectivamente) (Garte et al. 2001), mientras que en la población asiática es de 0.26 (Cosma et al. 1993).

Se encontró una relación directa entre el polimorfismo *CYP1A1*2C* y la presencia de enfermedades pulmonares en trabajadores italianos de minas de coque (expuestos a HAPs) (Brescia et al. 1999). En una región del sur de España, se encontró asociación de *CYP1A1*2C* con un incremento en la frecuencia de cáncer de pulmón (San José et al. 2010). Asimismo, la evaluación citogenética y molecular de policías en la ciudad de Praga ocupacionalmente expuestos a HAPs, mostró aberraciones cromosómicas y la presencia del polimorfismo *CYP1A1*2C* (Georgiadis et al. 2005; y Sram et al. 2007). La alta frecuencia de este polimorfismo en la población Tepehuana, permite especular la susceptibilidad a desarrollar cáncer. Sin embargo esta observación requiere de más estudios confirmatorios. Cabe destacar que en Durango, un estudio del Centro de Cancerología en población mestiza reportó que la mortalidad por cáncer en un periodo del 2001 al 2003 fue del 10%. En cuanto a morbilidad, el 34% de las mujeres padeció cáncer cervicouterino (cacu) y el 30%, cáncer de mama. En el caso de los tumores del sistema nervioso central (SNC), El 9% fue para hombres; en tanto que el 6% de los varones padeció cáncer de pulmón (Lares et al. 2010). En el 2006, la incidencia de tumores malignos de tráquea, bronquios y pulmón en hombres de Durango fue del 6%; y en mujeres fue del 2.6%. En lo referente al cáncer cervicouterino, el 15.9% de las mujeres lo padeció. En tanto que, el 19.8% de las mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de mama (INEGI, 2009).

El gen *CYP2D6* codifica una isoenzima que metaboliza una amplia gama de fármacos de interés terapéutico (Zanger et al. 2004). El gen que la codifica es altamente polimórfico. Dos alelos no funcionales dan origen al fenotipo metabolizador lento (ML), mientras que el fenotipo metabolizador rápido (MR) se debe a la presencia de uno o dos alelos con función normal: *CYP2D6*1* y *CYP2D6*2*. El estudio de las variantes alélicas de *CYP2D6* en los indígenas Tepehuanos de Durango previamente fenotipificados con dextrometorfán demostró la ausencia del fenotipo ML (Sosa-Macias et al. 2006). En este estudio se confirma la baja variabilidad del gen *CYP2D6* en este grupo étnico, que se había descrito previamente (Sosa-Macias et al. 2006).

En lo referente al metabolismo de tóxicos ambientales, se ha reportado que tanto los ML como los MR no presentan diferencias en la cantidad de aberraciones cromosómicas debidas a la exposición a la nitrosamina NNK [4'-(nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona] (Abdel-Rahman et al. 2011). Sin embargo,

se ha comprobado la activación mutagénica de compuestos derivados del humo de tabaco a través de CYP2D6 como las nitrosaminas NNN [N-Nitrosornicotina], NNK y NNA [4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-1-butanol] (Crespi et al. 1991).

En el presente estudio, la frecuencia de *CYP3A4*1B* fue de 0.08, similar a la reportada en población Tepehuana en un estudio previo (Reyes-Hernández et al. 2008). El polimorfismo *CYP3A4*1B* se ha asociado a la presencia de cáncer de próstata cuya frecuencia varía en diferentes poblaciones: 0.59 en afroamericanos, 0.10 en latinos, 0.08 en caucásicos y está ausente en asiáticos. Así, la baja frecuencia de cáncer de próstata en los últimos, podría relacionarse también con la baja frecuencia del alelo **1B* en población asiática (Zeigler et al. 2002 y Paris et al. 1999).

Existe evidencia del papel que juega *EPXH1* microsomal en la actividad enzimática involucrada en procesos degenerativos. El alelo mutante de *EPXH1 HYL *2*, conocido también como el alelo lento del exón 3, se encontró con una frecuencia de 0.46 en los indígenas Tepehuanos analizados. La frecuencia de este alelo en pacientes japoneses con EPOC fue de 0.44 (Yoshikawa et al. 2000). La alta similitud en las frecuencias alélicas de ambos grupos permite inferir en los indígenas Tepehuanos un riesgo alto de padecer EPOC. En sujetos taiwaneses el alelo *EPXH1 HYL *2* se observó con una frecuencia de 0.59 asociándose a una progresión severa de EPOC, especialmente en fumadores y exfumadores (Cheng et al. 2004).

En población caucásica, el alelo *EPXH1 HYL *2* parece tener un efecto retardante ante la progresión rápida de cáncer de próstata (Gsur et al. 2004). Sin embargo, la presencia de éste alelo en conjunto con el consumo de tabaco y alcohol parece favorecer el desarrollo de algunas enfermedades degenerativas (Guengerich et al. 1982; Seidegard et al. 1997; Sachse et al. 2002 y Cheng et al. 2004). En la población Tepehuana, el alelo *HYL *2* en conjunto con una alta exposición al humo de la quema de madera incrementaría el riesgo de desarrollar EPOC severa en esta población.

Finalmente, *GSTM1* juega un papel clave debido a su actividad como enzima de Fase II en la detoxificación de HAPs (Jakoby et al. 1978; Mannervik et al. 1985; Mannervik and Danielson, 1988; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html>); Kovalenko et al. 2009 y Tang et al. 2010). La ausencia de la enzima activa, junto con exposición frecuente a HAPs se relaciona con la presencia de diferentes tipos de cáncer (Hayes 1995; Bennet 1999). La alta frecuencia del genotipo *GSTM1*0/*0* en la población Tepehuana del presente estudio (0.72), fue mayor a la encontrada en población caucásica de origen europeo (0.50) (Hayes, 1995; Gronau et al. 2003) y a la observada en pacientes

de origen africano (0.22 a 0.38) (Bell et al. 1993; Arruda et al. 1998 y Piacentini et al. 2011), pero muy semejante a la encontrada en individuos brasileños de Río de Janeiro (0.66) y de Brasilia (0.67) (Hatagima et al. 2000). La delección de *GSTM1* se encontró con una frecuencia de 0.65 en pacientes japoneses con cáncer oral e incrementó en más de 2 veces el riesgo a desarrollar este tipo de cáncer en comparación con los controles que tenían *GSTM1* activo (Sato et al. 1999).

Si bien los genotipos son informativos, no pueden predecir por completo la susceptibilidad a desarrollar enfermedades crónico-degenerativas, por lo que deben evaluarse simultáneamente con biomarcadores de exposición y riesgo. Aunado a lo anterior, deben considerarse las diferencias inter-étnicas e inter-individuales.

El monitoreo biológico de exposición a HAPs en estudiantes universitarios holandeses mostró niveles urinarios de 1-OHP de $0.26 \mu\text{mol/mol}$ de creatinina (Jongeneelen et al. 1987 B). La medición del grado de exposición en una planta de aluminio en Suecia mostró un valor de $0.17 \mu\text{mol/mol}$ de creatinina (Alexandrie et al. 2000). En las comunidades de "El Centro y Domingo" de San Luis Potosí México, se evaluaron diferentes escenarios de exposición y se encontró que niños expuestos a la combustión del tráfico vehicular tuvieron valores de 1-OHP con una media igual a $0.2 \mu\text{mol/mol}$ de creatinina (Martínez-Salinas et al. 2010). Los niveles observados de 1-OHP en la población Tepehuana de este estudio fueron de $0.28 \mu\text{mol/mol}$ de creatinina, superiores a los descritos previamente. El valor mínimo observado fue de 0.22 y el máximo de $2.69 \mu\text{mol/mol}$ de creatinina. De acuerdo a la guía Benchmark propuesta por Jongeneelen en el 2001, se proponen dos valores de referencia fijados en 2.3 y $4.9 \mu\text{mol/mol}$ de creatinina que corresponden a dos tipos de industrias con exposición muy alta a HAPs; el primer valor es para los hornos de coque y el segundo, para fábricas de producción primaria de aluminio. Estos valores son los que establecen el OEL (Occupational Exposure Limit) acrónimo en inglés para el límite de exposición ocupacional.

En el caso de los indígenas Tepehuanos de Durango, la exposición a HAPs es mayoritariamente habitacional, pues el espacio de convivencia intrafamiliar se circunscribe a un solo espacio donde comen, duermen y pasan su tiempo cerca de las estufas de leña que tienen para calentar y cocinar sus alimentos. Esto explica los altos niveles urinarios de 1-OHP.

Esto último hace necesario implementar programas de mejoramiento de vivienda que permitan reducir los niveles de exposición a HAPs en comunidades indígenas.

Los niveles urinarios altos de 1-OHP en obreros metalúrgicos suecos expuestos a HAPs se relacionaron con la combinación genotípica *CYP1A1**1/*2C y *GSMT1**0/*0 (Alexandrie et al. 2000). Esta combinación genotípica se asocia también a niveles urinarios altos de 1-OHP en individuos fumadores no expuestos ocupacionalmente a HAPs; sin embargo esta asociación depende de la edad, grupo étnico y número de cigarros consumidos (Nerurkar et al. 2000).

En Taiwán, se reportaron valores de 1-OHP igual a 3.4 µmol/mol de creatinina en trabajadores de hornos de coque expuestos a HAPs, quienes presentaron la combinación genética *CYP1A1**2C, *CYP2E1**C2 y *GSTM1**0/*0 (Nan et al. 2001). Se ha reportado que el genotipo *GSTM1**0/*0 en asociación con un mayor tiempo de exposición crónica a HAPs influye de manera significativa en los niveles urinarios altos de 1-OHP. Esto se relaciona con un estudio previo que demostró que a un mayor tiempo de exposición efectiva asociado a la presencia de polimorfismos en genes relacionados con procesos de reparación del ADN, mayor es la susceptibilidad a desarrollar efectos adversos en núcleos celulares como aberraciones cromosómicas y aductos en ADN (Binkova et al. 2007).

Los análisis de correlación, de agrupamiento, de redes neuronales y de regresión logística en el presente estudio demostraron que los individuos tepehuanos portadores del genotipo *GSTM1**0/*0 y expuestos a la quema de biomasa, presentaron valores normales de 1-OHP urinario. Por el contrario, éstos análisis corroboraron que el genotipo *GSTM1**1/*1 en asociación con un mayor tiempo de exposición crónica a HAPS influyen de manera significativa en los niveles urinarios altos de 1-OHP. Ya que *GSTM1* juega un papel clave debido a su actividad como enzima de Fase II en la detoxificación de HAPs carcinogénicos encontrados en el humo de la quema de biomasa y en el humo de tabaco (Jakoby et al. 1978; Mannervik et al. 1985; Mannervik and Danielson, 1988; <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html>); Kovalenko et al. 2009 y Tang et al. 2010), se esperaba que la presencia de *GSTM1* favoreciera la normalización de los niveles urinarios de 1-OHP como lo reporta la literatura mediante la inactivación y conjugación de metabolitos que pueden ser más fácilmente excretados por vía renal (Gelboin 1980; Coles et al. 1990; Xue et al. 2005; Penning and Drury 2007; Harrigan et al. 2009; y Gelhaus et al. 2011) y no que estuviese relacionada con los niveles altos de 1-OHP urinario en los tepehuanos evaluados.

Po otro lado, se comprobó la influencia de la heterocigosidad en *EPXH1* *HYL**2 sobre los niveles urinarios altos de 1-OHP en tepehuanos; resultado asociado a la susceptibilidad a desarrollar enfermedades crónico-degenerativas como EPOC en otras poblaciones (Cheng et al. 2004).

El sexo puede ser una variable determinante en la concentración urinaria de 1-OHP, debido al ambiente laboral o habitacional; sin embargo en el presente estudio se encontró que independientemente del género, las concentraciones urinarias de 1-OHP se relacionan directamente con un mayor tiempo de exposición crónica a HAPs en ambientes habitacionales. Esta observación se ve reforzada por el hecho de que en este estudio, el alelo *CYP1A1*2C* en forma homo o heterocigota tiene una distribución similar entre hombres y mujeres con valores urinarios altos de 1-OHP.

Sin embargo, cabe destacar la existencia de otros genes codificantes de enzimas que bioactivan HAPs y que tienen una mayor expresión hepática (Alexandrie et al. 2000). Dentro de estos genes se encuentran *CYP1A2*, *CYP1B1* y *CYP2E1* (Alexandrov et al. 2002; Schneider et al. 2004; Khedaier et al. 2008 y Luo et al. 2011), así como *CYP2A6* (Zhu et al. 2013); y de conjugación, *NAT1*, *NAT2*, *GSTP1* y *GSTT1* (Godschalk et al. 2001). La evaluación de estos genes en la población indígena Tepehuana resulta obligatoria debido a los niveles urinarios altos de 1-OHP relacionados con una exposición alta a HAPs y que no está mediada por la delección de *GSTM1*. Con el fin de obtener un perfil completo de la interacción gen-ambiente-exposición en tepehuanos del sur, sería necesario analizar polimorfismos de genes de reparación como *XPB* (Xeroderma pigmentosum B) que en estudios previos mostraron tener influencia significativa sobre los efectos adversos causados por excesivas emisiones vehiculares en población general (Palli et al. 2001). La evaluación de tales genes permitiría identificar individuos en riesgo de desarrollar enfermedades crónico-degenerativas.

Finalmente, se concluye que los indígenas Tepehuanos mostraron niveles de 1-OHP urinario seis veces por encima de lo permitido por la norma del NHANES 2009. Y al evaluar la interacción gen-ambiente, se demostró que la alta incidencia de *GSTM1*0/*0* no favoreció la acumulación elevada de 1-OHP en orina. Por lo tanto, *GSTM1*0/*0* no podría utilizarse como biomarcador de susceptibilidad a mezclas de HAPs en población indígena tepehuana; si bien, la medición de la concentración del 1-OHP urinario si puede emplearse como biomarcador de riesgo por exposición a mezclas de HAPs en la etnia tepehuana.

X. PERSPECTIVAS

Se sugiere que en un futuro se analicen otras variantes genéticas involucradas en la bioactivación de HAPs en indígenas Tepehuanos. Tal es el caso del receptor hidrocarbonado de arilo (*Ahr*), *CYP1A2* y *CYP1B1*. Asimismo, podrían complementarse con marcadores de daño al ADN como el ensayo de micronúcleos y la determinación de la 8-hidroxi-2-deoxiguanosina.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Rahman SZ, Salama SA, Au WW, Hamada FA. Role of polymorphic CYP2E1 and CYP2D6 genes in NNK-induced chromosome aberrations in cultured human lymphocytes. *Pharmacogenetics*. 2000;10(3):239-249.

Aguilar-Salinas CA, Gómez-Pérez FJ, Rull J, Villalpando S, Barquera S, Rojas R. Prevalence of dyslipidemias in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *salud pública de méxico* 2006;52:44-53.

Alexandrie AK, Warholm M, Carstensen U, Axmon A, Hagmar L, Levin JO, Ostman C, Rannug A. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms affect urinary 1-hydroxypyrene levels after PAH exposure. *Carcinogenesis*. 2000;21(4):669-676.

Alexandrov K, Cascorbi I, Rojas M, Bouvier G, Kriek E and Bartsch H. CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. *Carcinogenesis*. 2002; 23 (12):1969-1977.

Amaral AF, Ramasamy A, Castro-Giner F, Minelli C, Accordini S, Sørheim IC, Pin I, Kogevinas M, Jøgi R, Balding DJ, Norbäck D, Verlato G, Olivieri M, Probst-Hensch N, Janson C, Zock JP, Heinrich J, Jarvis DL. Interaction between gas cooking and GSTM1 null genotype in bronchial responsiveness: results from the European Community Respiratory Health Survey. *Thorax*. 2014;69:558-564.

American Heart Association, Cigarette smoking and cardiovascular diseases. <[http:// www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4545](http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4545)>. Archivo recuperado de internet el 15 de noviembre de 2013. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4545>

Anderson CE, Loomis GA. Recognition and prevention of inhalant abuse. *Am Fam Physician*. 2003;68:869-874.

Aparicio MH, Estrada LA, Fernández RM, Ruiz M, Ramos D, Rosas M, et al. 2008. Manual de antropometría. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Departamento de Nutrición Aplicada y Educación Nutricional CONACYT.

Aparicio MH, Estrada LA, Fernández RM, et al. 2004. Manual de antropometría. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador

Zubirán". Departamento de Nutrición Aplicada y Educación Nutricional (2nd ed) CONACYT: 1-17.

Applied Biosystems protocols 2010. Applied Biosystems StepOne v2.2. Genotyping Experiments. Part Number 4376786 Rev. F

Arand M, Cronin A, Oesch F, Mowbray SL, Jones TA. The telltale structures of epoxide hydrolases. *Drug Metab Rev.* 2003 a; 35:365–383.

Arand M, Herrero Plana ME, Hengstler JG, Lohmann M, Cronin A, Oesch F. Detoxification strategy of epoxide hydrolase—the basis for a threshold in chemical carcinogenesis. *EXCLI J.* 2003c; 2:22–30.

Argiriadi MA, Morisseau C, Hammock BD, Christianson DW. Detoxification of environmental mutagens and carcinogens: structure, mechanism, and evolution of liver epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:10637-42.

Armstrong RN. Enzyme-catalyzed detoxication reactions: mechanisms and stereochemistry. *CRC Crit Rev Biochem.* 1987;22:39–88.

Arnold C, Konkel A, Fischer R, Schunck WH. Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep* 2010;62:536-47.

Arruda VR, Grignolli CE, Gonçalves MS, Soares MC, Menezes R, Saad ST, Costa FF. Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis? *Clin Genet.* 1998;54(3):210-4.

Arts JH, Mommers C, de Heer C. Dose–response relationships and threshold levels in skin and respiratory allergy, *Crit. Rev. Toxicol.* 2006; 36 (3):219–251.

Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res.* 2000; 464: 65–76.

Ayesh R, Idle JR, Ritchie JC, Crothers MJ, Hetzel MR. Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature.* 1984;312(5990):169-70.

Azarpira N, Ashraf MJ, Khademi B, Darai M, Hakimzadeh A, Abedi E. Study the polymorphism of CYP3A5 and CYP3A4 loci in Iranian population with laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2011;38(8):5443-8.

Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:3-28.

Bell DW, Brannigan BW, Matsuo K, Finkelstein DM, Sordella R, Settleman J, Mitsudomi T, and Haber DH. Increased Prevalence of EGFR-Mutant Lung Cancer in Women and in East Asian Populations: Analysis of Estrogen-Related Polymorphisms. *Clin Cancer Res.*2008; 14: 4079-4084.

Bertilsson L, Dahl ML, Dalén P, and Al-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: Clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol.* 2002; 53(2): 111–122.

Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29(3):192-209.

Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, Milcova A, Tulupova E, Farmer PB, and Srám RJ. PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat Res.* 2007; 620:49-61.

Bolt HM, Thier R. Relevance of the deletion polymorphisms of the glutathione S-transferases GSTT1 and GSTM1 in pharmacology and toxicology, *Curr. Drug. Metab.* 2006;7: 613–628.

Bonanni B, Macis D, Maisonneuve P, et al. Polymorphism in the CYP2D6 tamoxifen-metabolizing gene influences clinical effect but not hot flashes: data from the Italian Tamoxifen Trial. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 3708-9.

Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, Jin Y, Storniolo AM, Nikoloff DM, Wu L, Hillman G, Hayes DF, Stearns V, Flockhart DA. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 80: 61-74.

Bradford LD. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics.* 2002;3(2):229-243.

Brescia G, Celotti L, Clonfero E, Neumann HG, Forni A, Foà V, Pisoni M, Ferri G M, and Assennato G. The influence of cytochrome P450 1A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes on biomarker levels in coke oven workers. *Archives of Toxicology.* 1999;73 88-9):431-439.

Brockmüller J, Gross D, Kerb R, Drakoulis N, Roots I. Correlation between transstilbene oxide-glutathione conjugation activity and the deletion mutation in the glutathione S-transferase class Mu gene detected by polymerase chain reaction. *Biochem. Pharmacol.* 1992. 43, 647–650.

Cascorbi I, Brockmüller J, and Roots I. A C4887A Polymorphism in Exon 7 of Human CYP1A1: Population Frequency, Mutation Linkages, and Impact on Lung Cancer Susceptibility. *Cancer Research.* 1996; 56:4965-4969.

Centers for Disease Control and Prevention. Annual Smoking-Attributable Mortality, Years of Potential Life Lost, and Productivity Losses—United States, 2000–2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2008;57(45):1226–8 [accessed 2012 Dec 4].

Centers for Disease Control and Prevention. National Biomonitoring Program. CDC. Available at www.cdc.gov/biomonitoring/ - accessed March 2011. Archivo recuperado de internet el 28 de marzo de 2011. www.cdc.gov/biomonitoring/

Cerniglia C. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 1992, 3: 351–368.

Chau N, Bertrand JP, Mur JM, Figueredo A, Patris A, Moulin JJ, Pham QT. Mortality in retired coke oven plant workers. *Br. J. Ind. Med.* 1993, 50 (2), 127–135.

Cheng SL, Yu CJ, Chen CJ, Yang PC. Genetic polymorphism of epoxide hydrolase and glutathione S-transferase in COPD. *Eur Respir J* 2004; 23: 818–824.

Coke-Oven Emissions; Report on Carcinogens; National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services, 2011; pp 120–122. <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/CokeOvenEmissions.pdf>

Coller JK, Fritz P, Zanger UM, Siegle I, Eichelbaum M, Kroemer HK, Muddert TE. Distribution of microsomal epoxide hydrolase in humans: an immunohistochemical study in normal tissues, and benign and malignant tumours. *Histochem J.* 2001; 33:329–336.

Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. CDI. 2013. Tarahumaras-rarámuri and Tepehuanos del Sur O'dam. Archivo recuperado de internet el 2 de mayo de 2013:

http://www.cdi.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=609&Itemid=62

Committee on Human Biomonitoring for Environmental Toxicants, National Research Council. Human biomonitoring for environmental chemicals. National Academies Press, Washington 2006. Archivo recuperado de internet el 9 de noviembre de 2013. http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=11700

Cosma G, Crofts F, Taioli E, Toniolo P, Garte S. Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene. *J Toxicol Environ Health*. 1993;40(2-3):309-316.

Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis*. 1991;12(7):1197-201.

Crofts F, Cosma G, Currie D, Taioli E, Toniolo P, and Garte JS. A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans. 1993. *Carcinogenesis (Lond.)*, 9: 1729-1731.

Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P, Garte SJ. Functional significance of different human CYP1A1 genotypes. *Carcinogenesis* 1994; 15:2961–2963.

Dally H, Edler L, Jäger B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Drings P, Schulz V, Kayser K, Bartsch H, Risch A. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics*. 2003. 13(10):607-18.

Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Archivo recuperado de internet el 4 de febrero de 2010. <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>

Decker M, Arand M, Cronin A. Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Arch Toxicol*. 2009;83:297-318.

Devore J. Probabilidad y Estadística para Ingeniería y Ciencias. 2001. 5ª ed. México: Thompson.

Duale N, Bjellaas T, Alexander J, Becher G, Haugen M, Paulsen JE, Frandsen H, Olesen PT, Brunborg G. Biomarkers of human exposure to acrylamide and relation to polymorphisms in metabolizing genes. *Toxicol Sci*. 2009;108(1):90-9.

Dusinska M, Staruchova M, Horska A, Smolkova B, Collins A, Bonassi S, Volkovova K. Are glutathione S transferases involved in DNA damage signalling? Interactions with DNA damage and repair revealed from molecular epidemiology studies. *Mutat Res.* 2012;736:130-137.

ENSANUT 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. [online] Available from: http://ensanut.insp.mx/doctos/ENSANUT2012_PresentacionOficialCorta_09Nov2012.pdf. [Accessed 11 July 2013].

Enzimas Glutación S Transferasas (GSTs) [EC 2.5.1.18] (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html>). Archivo recuperado de internet el 19 de octubre de 2012 <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html>

Environmental Health Criteria 237. Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals. WHO, 2006. Archivo recuperado de internet el 9 de noviembre de 2013. <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc237.pdf>

Environmental Protection Agency (EPA). (2009) National Ambient Air Quality Standards. Air and Radiation <http://www.epa.gov/air/criteria.html>. Archivo recuperado de internet el 29 de junio de 2014.

Ervin RB. Prevalence of Metabolic Syndrome Among Adults 20 Years of Age and Over, by Sex, Age, Race and Ethnicity, and Body Mass Index: United States, 2003–2006. Division of Health and Nutrition Examination Surveys. NHANES Survey. Number 15. May 5. 2009. Archivo recuperado de internet el 4 de Agosto de 2013. <http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm> (NHANES) 2003–2006.

Falany CN, McQuiddy P, Kasper CB. Structure and organization of the microsomal xenobiotic epoxide hydrolase gene. *J Biol Chem.* 1987;262:5924–5930.

Felix CA, Walker AH, Lange BJ, Williams TM, Winick NJ, Cheung NK, Lovett BD, Nowell PC, Blair IA, Rebbeck TR. Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(22):13176-13181.

Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. 2009. Recuperado de internet el 11 de noviembre de 2013. <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/fourthreport.pdf>

Fragoso JM, Juárez-Cedillo T, Hernández-Pacheco G, Ramírez E, Zuñiga J, Izaguirre R, de la Peña A, Granados J, and Vargas-Alarcón G. Cytochrome P4501A1 polymorphisms in the Amerindian and Mestizo populations of Mexico. *Cell Biochem Funct.* 2005; 23: 189–193.

Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng.* 2006;23(4):149–169.

Gallegos-Arreola MP, Figuera-Villanueva LE, Troyo-Sanroman R, Morgán-Villela G, Puebla-Pérez AM, Flores-Marquez MR, Zúñiga-González GM. CYP1A1 *2B and *4 polymorphisms are associated with lung cancer susceptibility in Mexican patients. *Int J Biol Markers.* 2008;23(1):24-30.

Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(12):1239-48.

Garte S, Taioli E, Raimondi S, Paracchini V, Binkova B, Srám RJ, Kalina I, Popov TA, Singh R and Farmer PB. Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHS: Results from the EXPAH study. *Mutat Res.* 2007; 620:7-15.

Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T. CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genet Mol Biol.* 2004; 27(2): 133-138.

Gelhaus SL, Harvey RG, Penning TM, Blair IA. Regulation of benzo[a]pyrene-mediated DNA- and glutathione-adduct formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human lung cells. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(1):89-98.

Gemignani ML. Breast cancer screening for women 40 to 49 years of age: what is a clinician to do? *Obstet Gynecol.* 2007;110(3):548-9.

Georgiadis P, Topinka J, Vlachodimitropoulos D, Stoikidou M, Gioka M, Stephanou G, Autrup H, Demopoulos NA, Katsouyanni K, Sram R, Kyrtopoulos SA. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. *Carcinogenesis.* 2005;26(1):93-101.

Gherzi-Egea JF, Perrin R, Leininger-Muller B, Grassiot MC, Jeandel C, Floquet J, Cuny G, Siest G, Minn A. Subcellular localization of cytochrome P450, and

activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochem Pharmacol.* 1993;45(8):647-658.

Gjerde J, Hauglid M, Breilid H, Lundgren S, Varhaug JE, Kisanga ER, Mellgren G, Steen VM, Lien EA. Effects of CYP2D6 and SULT1A1 genotypes including SULT1A1 gene copy number on tamoxifen metabolism. *Ann Oncol* 2008; 19: 56-61.

Gelboin HV. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* 1980. 60 (4), 1107–1166.

Glatt HR, Wolfel T, Oesch F. Determination of epoxide hydrolase activity in whole cells (human lymphocytes) and activation by benzoflavones. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983; 110:525-529.

Godschalk RW, Ostertag JU, Zandsteeg AM, Van Agen B, Neuman HA, Van Straaten H, Van Schooten FJ. Impact of GSTM1 on aromatic-DNA adducts and p53 accumulation in human skin and lymphocytes. *Pharmacogenetics.* 2001;11(6):537-543.

Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Weinshilboum RM, Fritcher EG, Nibbe AM, Desta Z, Nguyen A, Flockhart DA, Perez EA, Ingle JN. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 101: 113-121.

Goetz MP, Rae JM, Suman VJ, Safgren SL, Ames MM, Visscher DW, Reynolds C, Couch FJ, Lingle WL, Flockhart DA, Desta Z, Perez EA, Ingle JN. Pharmacogenetics of tamoxifen biotransformation is associated with clinical outcomes of efficacy and hot flashes. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 9312-8.

Gronau S, Koenig-Greger D, Jerg M, Riechelmann H. GSTM1 enzyme concentration and enzyme activity in correlation to the genotype of detoxification enzymes in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Dis.* 2003;9(2):62-67.

Gsur A, Feik E, Madersbacher S. Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol.* 2004; 21: 414–423.

Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991; 4: 391–407.

Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:1–17.

Guengerich FP. "Epoxide hydrolase: properties and metabolic roles", *Reviews in Biochemical Toxicology*, 1982;4:5-30.

Hakura A, and Sonoda J. Benzo(a)Pirene and colonic cancer. Chapter 2. In pyrene. Editors. Petr Ruzicka y Tomas Kral. Nova Science Publishers. 2013. Chapter 2. Pp.43-78. ISBN: 978-1-62417-291-5.

Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Ersing N, Box HC, Maccubbin AE, Olson JR. DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci*. 2004 Feb;77(2):307-14.

Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. "Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants". *Hum Mol Genet*. 1994;3(3): 421-428.

Hatagima A, Klautau-Guimarães MN, Silva FP and Cabello PH. Glutathione S-transferase M1(GSTM1) polymorphism in two Brazilian populations. *Genet Mol Biol*. 2000; 23:709-713.

Hayashi S-I, Watanabe J, Nakachi K, and Kawajiri K. Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 IA] gene. *J. Biochem*. 1991; 110:407-411.

Hayes JD, Pulford DJ. 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.

Hazardous Substances data Bank. Toxnet. Nlm.nih.gov Archivo recuperado de internet el 4 de marzo de 2013.

<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7092>

He XF, Liu ZZ, Xie JJ, Wang W, Du YP, Chen Y, Wei W. Association between the CYP3A4 and CYP3A5 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis and meta-regression. *Tumour Biol*. 2014 Jul 4. [Epub ahead of print].

Hildebrand CE, Gonzalez FJ, McBride OW, and Nebert DW. Assignment of the human 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-inducible cytochrome P450 gene to chromosome 15. *Nucleic Acids Res*. 1985;13:2009-2016.

Hockley SL, Arlt VM, Brewer D, Te Poele R, Workman P, Giddings I, Phillips DH. 2007. AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines. *Chem. Res. Toxicol.* 20,1797–1810.

Hodis HN, Mack WJ, Krauss RM, Alaupovic P. Pathophysiology of triglyceride-rich lipoproteins in atherothrombosis: clinical aspects. *Clin Cardiol* 1999;22:15-20.

Hu G, Shi Z, Hu J, Zou G, Peng G, Ran P. Association between polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase and COPD: results from meta-analyses. *Respirology.* 2008;13:837-50.

Hung RJ, Boffetta P, Brockmüller J, Butkiewicz D, Cascorbi I, Clapper ML, Garte S, Haugen A, Hirvonen A, Anttila S, Kalina I, Le Marchand L, Londodn SJ, Rannug A, Romkes M, Salagovic J, Schoket B, Gaspari L, and Taioli E. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis.* 2003;24(5):875-882.

Ihsan R, Chattopadhyay I, Phukan R, Mishra AK, Purkayastha J, Sharma J, Zomawia E, Verma Y, Mahanta J, Saxena S, Kapur S. Role of epoxide hydrolase 1 gene polymorphisms in esophageal cancer in a high-risk area in India. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25:1456-62.

Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003. 369(1):89–104.

International Agency for Research on Cancer 2014. Monographs. <http://www.iarc.fr/> Archivo recuperado de internet el 30 de junio de 2014.

IARC 2014. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 92. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon: International Agency for Research on Cancer (in press).

IARC 1985. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenicity of Chemicals to Humans, Vol. 35, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 4: Bitumens, Coal-Tars and Derived Products, Shale-Oils and Soots, Lyon.

INEGI. Mujeres y Hombres en México 2009. Décimo tercera edición. http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integr

[acion/sociodemografico/mujeresyhombres/2009/MyH_2009_1.pdf](#). Archivo recuperado de internet el 21 de diciembre de 2014.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology. EC 2.5.1.18. In: IUBMB Enzyme Nomenclature. (Database). London, United Kingdom: Department of Chemistry, Queen Mary, University of London, 2007. (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC2/5/1/18.html>).

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. 2012. Normas mexicanas de calidad del aire. <http://www.inecc.gob.mx/calibre-informacion-basica/559-calibre-nom-cal-aire> Archivo recuperado de internet el 29 de junio de 2014.

Ishibe N, Wiencke JK, Zuo Z, McMillan A, Spitz M, and Kelsey KT. Susceptibility to Lung Cancer in Light Smokers Associated with CYP1A1 Polymorphisms in Mexican- and African-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:1075-1080.

Jakoby WB. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1978;46:383-414.

Jin Y, Desta Z, Stearns V, Ward B, Ho H, Lee KH, Skaar T, Storniolo AM, Li L, Araba A, Blanchard R, Nguyen A, Ullmer L, Hayden J, Lemler S, Weinshilboum RM, Rae JM, Hayes DF, Flockhart DA. CYP2D6 genotype, antidepressant use, and tamoxifen metabolism during adjuvant breast cancer treatment. *J Nat Cancer Inst* 2005; 97: 30-39.

Johnson R, Kuby P, eds. *Estadística Elemental*. 2004. 3ra ed. México: Thompson.

Jongeneelen FJ. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann Occup Hyg.* 2001;45(1):3-13.

Jongeneelen FJ. Biological Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons; 1-hydroxypyrene in urine of people. *Toxicol Lett.* 1994; 72(1-3): 205-211.

Jongeneelen FJ, Anzion RBM, and Henderson PT. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chrom.* 1987; 413: 227-232.

Jongeneelen FJ. 1987B. Biological monitoring of occupational exposure to PAH. Ph.D thesis, University of Nijmegen.

Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Iscan M. Expression of CYP3A4 in human breast tumour and non-tumour tissues. *Cancer Lett.* 2003;202:17-23.

Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S-I. The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev Oncol/Hematol* 1993; 14:77-87.

Keshava C, McCanlies EC, Weston A. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol.* 2004;160(9):825-841.

Kisselev P, Schunck WH, Roots I, Schwarz D. Association of CYP1A1 polymorphisms with differential metabolic activation of 17beta-estradiol and estrone. *Cancer Res.* 2005;65:2972–2978.

Kiss I, Orsós Z, Gombos K, Bogner B, Csejtei A, Tibold A, Varga Z, Pázsit E, Magda I, Zölyomi A, Ember I. Association between allelic polymorphisms of metabolizing enzymes (CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2E1, mEH) and occurrence of colorectal cancer in Hungary. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug;27(4C):2931-7.

Kiyohara C, Nakanishi Y, Inutsuka S, et al. The relationship between CYP1A1 and aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population. *Pharmacogenetics.* 1998; 8: 315-23.

Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmöller J, Hustert E, Burk L, Nuessler A, Neuhaus P, Eichelbaum M, Zanger U, and Wojnowski L. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of Cytochrome P450 3A mRNA. *Drug metabolism and disposition.* 2002;30: 1108-1114.

Kondo S, Sturgis EM, Li F, Wei Q, Li G. GSTM1 and GSTT1 null polymorphisms and risk of salivary gland carcinoma. *Int J Clin Exp Med.* 2009;2:68-75.

Koren HS, Graham DE, Delvin RB. Exposure of humans to a volatile organic mixture. III. Inflammatory response. *Arch. Environ. Health.* 1992; 47 (1): 39-44.

Kovalenko OA, and Santos JH. Analysis of oxidative damage by gene-specific quantitative PCR. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 2009. Jul;Chapter 19:Unit 19.1

Kroetz DL, Bradley MK, McFarland LV, Loiseau P, Wilensky AJ, Levy RH. Measurement of in vivo microsomal epoxide hydrolase activity in white subjects. *Clin Pharm Ther.* 1993;53:306-315.

Kudzi W, Doodoo AN, Mills JJ. Genetic polymorphisms in MDR1, CYP3A4 and CYP3A5 genes in a Ghanaian population: a plausible explanation for altered metabolism of ivermectin in humans? *BMC Med Genet.* 2010;14;11:111.

Kuusimäki L, Peltonen Y, Mutanen P, Peltonen K, Savela K. Urinary hydroxy-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004;77(1):23-30.

Kwadijk-de Gijssel S, Bijl MJ, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Vulto AG, van Gelder T, Ch Stricker BH. Variation in the CYP2D6 gene is associated with a lower serum sodium concentration in patients on antidepressants. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68(2):221-5.

Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(10):1271-1294.

Lares-Asseff I, García-Hernández F, Sosa-Macías M, Loera-Castañeda V, Galaviz-Hernández C, Carrete-Ramírez A. Morbilidad y mortalidad por cáncer: experiencia del Centro Estatal de Cancerología de la SSA del Estado de Durango, México. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 2010; 48(3)229-241.

Leal-Berumen I, Santana-Rodríguez V, Hernández-Rodríguez P, et al. Screening for metabolic syndrome risk factors in mestizo, tarahumara and menonite scholars from Chihuahua Mexico. *BMC Proceedings* 2012;6(Suppl 3): 31.

Lee K, Cáceres D, Varela N, Csendes DA, Rios RH, Quiñones SL. Variantes Alélicas de CYP1A1 y GSTM1 como biomarcadores de susceptibilidad a cáncer gástrico: influencia de los hábitos tabáquico y alcohólico. *Rev. Med Chile* 2006; 134:1107-1115.

Lee KM, Kang D, Clapper ML, Ingelman-Sundberg M, Ono-Kihara M, Kiyohara C, Min S, Lan Q, Le Marchand L, Lin P, Lung ML, Pinarbasi H, Pisani P, Srivatanakul P, Seow A, Sugimura H, Tokudome S, Yokota J, Taioli E. CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 Polymorphisms, Smoking, and Lung Cancer Risk in a Pooled Analysis among Asian Populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008;17 (5): 1120-1126.

Leng SG, Zheng YX, Huang CF, Dai YF, Li XH, Niu Y, Pan ZF, Li T, He FS. Effect of genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase on urinary 1-hydroxypyrene levels in coke oven workers. *Journal of industrial hygiene and occupational diseases.* 2004;22(4):245-9.

Livingstone DR. 1994. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1:88–95.

Lozano R, Murray CJL, Lopez AD, et al. Miscoding and misclassification of ischemic heart disease mortality. Global Programme on Evidence for Health Policy Working Paper No. 12. World Health Organization. September 2001. [online] Available from: <http://www.who.int/healthinfo/paper12.pdf> [Accessed 11 September 2013].

Luch A. (2005) Nature and nurture—lessons from chemical carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 113–125.

Luo YP, Chen HC, Khan MA, Chen FZ, Wan XX, Tan B, Ou-Yang FD, Zhang DZ. Genetic polymorphisms of metabolic enzymes-CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1, and gastric carcinoma susceptibility. *Tumour Biol.* 2011; 32(1):215-22.

Ma Q. and Lu A. Y. H. 2007. CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metab. Dispos.* 35, 1009–1016.

Mahadevan B, Keshava C, Musafia-Jeknic T, Pecaj A, Weston A, and Baird W. M. Altered gene expression patterns in MCF-7 cells induced by the urban dust particulate complex mixture standard reference material 1649a. *Cancer Res.* 2005; 65 (4), 1251–1258.

Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol.* 1985;57:357-417.

Mannervik B, Danielson UH. Glutathione transferases—structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem.* 1988;23:283–337.

McMurry MP, Cerqueira MT, Connor SL, et al. Changes in lipid and lipoprotein levels and body weight in Tarahumara Indians after consumption of an affluent diet. *N Engl J Med* 1991;325:1704-1708.

McMurry MP, Connor WE, Cerqueira MT. 1982. Dietary Cholesterol and the Plasma Lipids and Lipoproteins in the Tarahumara Indians: a people habituated to a low cholesterol diet after weaning. *Am J Clin Nutr* 1982;35:741-744.

Meng X, Liu Y, Liu B. Glutathione S-transferase M1 null genotype meta-analysis on gastric cancer risk. *Diagn Pathol.* 2014 Jun 19;9:122. doi: 10.1186/1746-1596-9-122.

Miller EC, and Miller JA. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules. *Cancer* 1981; 47:2327-2345.

Miller AG, Whitlock JP Jr. Novel variants in benzo(a)pyrene metabolism. Isolation by fluorescence-activated cell sorting. *J Biol Chem.* 1981B Mar 10;256(5):2433-7.

Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejía-loza V, Serrano L, Albores A, Salinas JE, and Camacho-Carranza R. Genotype Frequencies of Polymorphic GSTM1, GSTT1, and Cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Human Biology.* 2007;79: 299–312.

Morgan DP. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, fourth ed., U.S. Environmental Protection Agency, EPA-540/9-88-001, Washington, DC, March 1989.

Nan HM, Kim H, Lim HS, Choi JK, Kawamoto T, Kang JW, Lee CH, Kim YD, Kwon EH. Effects of occupation, lifestyle and genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 on urinary 1-hydroxypyrene and 2-naphthol concentrations. *Carcinogenesis.* 2001; 22 (5): 787-793. doi: 10.1093/carcin/22.5.787

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Archivo recuperado de internet del periodo de noviembre de 2010 a diciembre de 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nebert DW, and Dieter ZM. The Evolution of Drug Metabolism. *Pharmacol* 2000; 61:124-135.

Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbonreceptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 2004. 279, 23847–23850.

Nebert DW, and Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6, 947–960.

Nerurkar PV, Okinaka L, Aoki C, Seifried A, Lum-Jones A, Wilkens LR, and Le Marchand L. CYP1A1, GSTM1, and GSTP1 Genetic Polymorphisms and Urinary 1-Hydroxypyrene Excretion in Non-Occupationally Exposed Individuals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1119–1122.

Nomenclature of CYP alleles. Archivo recuperado de internet durante el periodo de noviembre de 2010 a diciembre de 2013. <http://www.imm.ki.se/cypalleles>.

Nukaya M, and Bradfield CA. Conserved genomic structure of the Cyp1a1 and Cyp1a2 loci and their dioxin responsive elements cluster. *Biochem Pharmacol.* 2009;15; 77(4): 654–659.

Omiecinski CJ, Hassett C, Hosagrahara V. Epoxide hydrolase—polymorphism and role in toxicology. *Toxicol Lett.* 2000;112–113:365–370.

Ozeki J, Uno S, Ogura M, Choi M, Maeda T, Sakurai K, Matsuo S, Amano S, Nebert DW, Makishima M. Aryl hydrocarbon receptor ligand 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin enhances liver damage in bile duct-ligated mice. *Toxicology.* 2011;280(1-2):10-7.

Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 'pie'. *Drug Metab Dispos* 2006; 34: 880–886.

Palackal NT, Lee SH, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *J. Biol. Chem.* 2002, 277 (27), 24799–24808.

Paleoamerican origins. Smithsonian Institute. Archivo recuperado de internet el 12 de Julio de 2012. http://www.si.edu/Encyclopedia_SI/nmnh/origin.htm

Palli D, Russo A, Masala G, Saieva C, Guarrera S, Carturan S, Munnia A, Matullo G, Peluso M. DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int J Cancer.* 2001;94(1):121-7.

Papadopoulos D, Jornvall H, Rydstrom J, DePierre JW. Purification and initial characterization of microsomal epoxide hydrolase from the human adrenal gland. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1206:253-262.

Papadopoulos D, Seidegard J, Rydstrom J. Metabolism of xenobiotics in the human adrenal gland. *Cancer Lett.* 1984; 22:23-30.

Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8: 901-905.

Parl FF. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk, *Cancer Lett.* 2005; 221: 123–129.

Patten CA, Rummans TA, Croghan IT, Hurt RD, Hays JT. Development of depression during placebo-controlled trials of bupropion for smoking cessation: case reports. *J Clin Psychiatry*. 1999;60(7):436-441.

Pavanello S, Pulliero A, Siwinska E, Mielzynska D, and Clonfero E. Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear White blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis*. 2005;26(1):169-75.

Penn A, Snyder CA. 1,3-Butadiene exposure and cardiovascular disease. *Mutat Res*. 2007;621(1-2):42-49.

Penn, Snyder CA. 1,3-Butadiene, a vapor phase component of environmental tobacco smoke, accelerates arteriosclerotic plaque development, *Circulation*. 1996; 93(3):552–557.

Penning TM, Drury JE. Human aldo-keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Aug 15;464(2):241-50.

Perfil sociodemográfico de la gente que habla lengua indígena. INEGI 2009. Archivo recuperado de internet el 14 de marzo de 2013.

http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/poblacion_indigena/leng_indi/PHLI.pdf

Pérez-Morales R, Castro-Hernández C, Gonsebatt ME, Rubio J. Polymorphism of CYP1A1*2C, GSTM1*0, and GSTT1*0 in a Mexican Mestizo population: a similitude analysis. *Hum Biol*. 2008; 80: 457-65.

Pérez-Morales R, Méndez-Ramírez I, Castro-Hernández C, Martínez-Ramírez OC, Gonsebatt ME, Rubio J. Polymorphisms associated with the risk of lung cancer in a healthy Mexican Mestizo population: Application of the additive model for cancer. *Genet Mol Biol*. 2011; 34: 546-552.

Phillips DH. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 1999;443:139–147.

Piacentini S, Polimanti R, Porreca F, Martínez-Labarga C, De Stefano GF, and Fuciarelli M. GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms in European and African populations. *Mol Biol Rep*. 2011;38:1225–1230.

Quiñones L, Lee K, Varela N, Escala M, García K, Godoy L, Castro A, Soto J, Saavedra I, Cáceres D. Farmacogenética del Cáncer: Estudio de variaciones

genéticamente determinadas en la susceptibilidad a cáncer por exposición a xenobióticos. *Rev. Médica Chile* 2006; 134:499-515.

Ratanasavanh D, Beaune P, Baffet G, Rissel M, Kremers P, Guengerich FP, Guillouzo A. Immunocytochemical evidence for the maintenance of cytochrome P-450 isozymes, NADPH cytochrome c reductase, and epoxide hydrolase in pure and mixed primary cultures of adult human hepatocytes. *J Histochem Cytochem* 1986;34:527-533.

Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, and Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998; 90: 1225–1229.

Reyes-Hernández OD, Lares-Asseff I, Sosa-Macias M, Vega L, Albores A, Elizondo G. A Comparative Study of CYP3A4 Polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo Populations. *Pharmacology* 2008;81:97–103.

Reyes Valdez JA. 2006. Tepehuanes del Sur. México, D.F. Comisión Nacional de Pueblos Indígenas (CDI). Archivo recuperado de internet el 12 de enero de 2011

http://www.cdi.gob.mx/index.php?option=com_content&task=view&id=609&Itemid=62

Principales resultados del Censo de Población y Vivienda 2010. Durango. INEGI.

http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/poblacion/2010/princi_result/dgo/10_principales_resultados_cpv2010-3.pdf

Rudkowska I, Dewailly E, Hegele RA, Boiteau V, Dubé-Linteau A, Abdous B, Giguere Y, Chateau-Degat ML, Vohl MC. Gene–diet interactions on plasma lipid levels in the Inuit population. *Br J Nutr* 2013;109:953–961.

Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet.* 1997;60(2):284-95.

Sachse C, Smith G, Murray JW, Barrett JH, Waxman R, Sullivan F, Forman D, Bishop TC, Wolf R. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2002; 23(11):1839–1849.

Saito I, Dohi Y, Shimaoka H, Yonemasu K, Inami F. Prevalence of exposure to environmental tobacco smoke among rural Japanese. *Japanese journal of public health*. 2004;51(3):197-204.

San José C, Cabanillas A, Benitez J, Carrillo JA, Jimenez M, and Gervasini G. CYP1A1 gene polymorphisms increase lung cancer risk in a high-incidence region of Spain: a case control study. *BMC Cancer* 2010; 10:463.

Sato M, Sato T, Izumo T and Amagasa T. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis*.1999;20(10):1927-1931.

Scherer G, Frank S, Riedel K, Meger-Kossien I, Renner T. Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:373–380.

Schneider J, Bernges U, Philipp M, and Voitowitz HJ. CYP1A1 and CYP1B1 Polymorphism and Lung Cancer Risk in Relation to Tobacco Smoking. *Cancer Genomics & Proteomics*. 2004;1: 189-198.

Schocket B. Monitoring occupational exposure to carcinogens. *IARC Sci Publ* 1993:341–347.

Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, Simon W, Eichelbaum M, Brauch H. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 2007; 25: 5187-5193.

Schwarz D, Kisselev P, Ericksen SS, Szklarz GD, Chernogolov A, Honeck H, Schunck WH, Roots I. Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1445-1457.

Schwarz D, Kisselev P, Chernogolov A, Schunck WH, Roots I. Human CYP1A1 variants lead to differential eicosapentaenoic acid metabolite patterns. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336:779–783.

Scorecard pollution information site, Health effects: cardiovascular toxicants. <http://www.scorecard.org>. Archivo recuperado de internet el 13 de noviembre de 2013. <http://www.scorecard.org>.

Seagrave J, McDonald JD, Bedrick E, Edgerton ES, Gigliotti AP, Jansen JJ, Ke L, Naeher LP, Seilkop SK, Zheng M, Mauderly JL. Lung toxicity of ambient particulate matter from southeastern U.S. sites with different contributing

sources: relationships between composition and effects. *Environ Health Perspect.* 2006;114:1387-1393.

Seeringer A, Kirchheiner J. Pharmacogenetics-guided dose modifications of antidepressants. *Clin Lab Med.* 2008;28(4):619-26.

Seidegard J, and Ekström G. The Role of Human Glutathione Transferases and Epoxide Hydrolases in the Metabolism of Xenobiotics. *Environ Health Perspect.* 1997;105 (4):791-802.

Seidegard J, DePierre JW, and Pero RW. Measurement and characterization of membrane-bound and soluble epoxide hydrolase activities in resting mononuclear leukocytes from human blood. *Cancer Res.* 1984;44:3654-3660.

Servicios de Salud de Durango. Subdirección de Estadística e Informática. Principales Causas de Morbilidad General. Estado de Durango. 2011. Archivo recuperado de internet el 3 de diciembre de 2012. <http://salud.durango.gob.mx/>

Shimada T, Guengerich FP. Evidence for cytochrome P-450NF, the nifedipine oxidase, being the principal enzyme involved in the bioactivation of aflatoxins in human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(2):462-5.

Shimada T, Yun CH, Yamasaki H, Gautier C, Beaune PH, Guengerich P. Characterization of human lung microsomal cytochrome P450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens. *Mol Pharmacol* 1992;41:856-64.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol.Exp Ther* 1994; 270: 414–423.

Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, and Sutter TR. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. 1996. *Cancer Res.* 56, 2979–2984.

Shimada T, Yamazaki H, Foroozesh M, Hopkins NE, Alworth WL, Guengerich FP. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem Res Toxicol* 1998;11:1048–1056.

Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. 2004. *Cancer Sci.* 95,1–6.

Sims P, Grover PL, Swaisland A, Pal K, and Hewer A. Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature*. 1974; 252 (5481), 326–328.

Sims RC, Overcash MR. Fate of polynuclear aromatic-compounds (PNAS) in soil-plant systems. *Residue Rev*. 1983.88, 1–68.

Sipes IG, and Gandolfi AJ. Biotransformation of toxicants. In: Amdur, M.; Doull, J.; Klaassen, C., editors. *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill; New York: 1991. p. 88-126.

<http://bioinfo.iconcologia.net/SNPStats>

Sram RJ, Beskid O, Rössnerova A, Rössner P, Lnenickova Z, Milcova A, Solansky I, Binkova B. Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons--the interpretation of cytogenetic analysis by FISH. *Toxicol Lett*. 2007;30(1-2):12-20.

Staal YC, van Herwijnen MH, van Schooten FJ, and van Delft JH. Modulation of gene expression and DNA adduct formation in HepG2 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons with different carcinogenic potencies. *Carcinogenesis*. 2006; 27 (3), 646–655.

Strange RC, Jones PW, Fryer AA. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicol Lett*. 2000;112-113:357-363.

Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res*. 2001;482(1–2):21–26.

Talalay P. Chemoprotection against cancer by induction of phase 2 enzymes. *Biofactors*. 2000;12:5-11.

Tang SC, Sheu GT, Wong RH, Huang CY, Weng MW, Lee LW, Hsu CP, and Ko JL. Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol Letters*. 2010; 192: 316-323.

Taussky HH. A microcolorimetric determination of creatine in urine by the Jaffe reaction. *J Biol Chem*. 1954;208(2):853-861.

Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, Zhang X, Yusuf S; INTERHEART Study Investigators. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet*. 2006;368:647-658.

Thomas H, Timms CW, Oesch F. Epoxide hydrolases: molecular properties, induction, polymorphisms and function. In: *Frontiers in Biotransformation*. Ruckpaul K, Rein H, eds. Berlin: Akademie-Verlag, 1990;2:278-337.

Thummel KE, Wilkinson GR: In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 389–430.

Tolbert PE. Oils and cancer. *Cancer Causes Control* 1997;8:386–405.

TOXNET 2014. Toxicology Data Network. Hazardous Substances data Bank. Archivo recuperado de internet el 29 de junio de 2014. <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7092>.

U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2004. Archivo recuperado de internet el 4 de diciembre de 2012. http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/2004/

Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther.* 2000;68(1):82-91.

Wang S, Chanok S, Tang D, Li Z, Jedrychowski W and Perera FP. Assessment of Interactions between PAH Exposure and Genetic Polymorphisms on PAH-DNA Adducts in African American, Dominican and Caucasian Mothers and Newborns. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(2):405-412.

Watson RE, Jacobson CF, Williams AL, Howard WB, DeSesso JM. Trichloroethylene-contaminated drinking water and congenital heart defects: a critical analysis of the literature. *Reprod Toxicol.* 2006;21:117-147.

WHO 2013. World Health Organization. A global brief on hypertension. Silent killer, global public health crisis. [online] Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf [Accessed September 11 2013].

WHO 2006. Air Quality Guidelines: Global Update 2005. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.

http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/78638/E90038.pdf Archivo recuperado de internet el 11 de noviembre de 2013.

Wilson SC, Jones KC. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic-hydrocarbons (PAHS) – a review. *Environ. Pollut.* 1993;8, 229–249.

Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology.* 2003;38:978–988.

Yuan X, Zhou G, Zhai Y, Xie W, Cui Y, Cao J, Zhi L, Zhang H, Yang H, Zhang X, Qiu W, Peng Y, Zhang X, Yu L, Xia X, He F. Lack of Association between the Functional Polymorphisms in the Estrogen-Metabolizing Genes and Risk for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:3621-3627.

Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class Mu glutathione S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion. *J Biol Chem.* 1998;273:3517-3527.

Xue W, and Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2005; 206: 73-96.

Yang SK, and Silverman BD. Editors. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Carcinogenesis: Structure activity Relationships. CRC Press; Boca Raton, FL: 1988.

Yeh CC, Sung FC, Kuo LT, Hsu WP, Chu HY. Polymorphisms of cytochrome P450 1A1, cigarette smoking and risk of coronary artery disease. *Mutat Res* 2009;667:77–81.

Yoshikawa M, Hiyama K, Ishioka S, Maeda H, Maeda A, Yamakido M. Microsomal epoxide hydrolase genotypes and chronic obstructive pulmonary disease in Japanese. *Int J Mol Med.* 2000;5(1):49-53.

Zanger UM, Raimundo S, and Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369(1): 23–37.

Zeliger HI. Toxic effects of chemical mixtures, *Arch. Environ. Health.* 2003; 58 (1):23–29.

Zhao W, Luo J, Cai X. Association between microsomal epoxide hydrolase 1 polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013;34:2383-8.

Zhou LP, Yao F, Luan H, Wang YL, Dong XH, Zhou WW, Wang QH. CYP3A4*1B polymorphism and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Tumour Biol.* 2013;34:649-60.

Zhu AZ, Binnington MJ, Renner CC, Lanier AP, Hatsukami DK, Stepanov I, Watson CH, Sosnoff CS, Benowitz NL, Tyndale RF. Alaska Native smokers and smokeless tobacco users with slower CYP2A6 activity have lower tobacco consumption, lower tobacco-specific nitrosamine exposure and lower tobacco-specific nitrosamine bioactivation. *Carcinogenesis.* 2013; 34(1):93-101.

XII. ANEXOS

XII.1. Discriminación alélica para CYP1A1*2C por tiempo real.

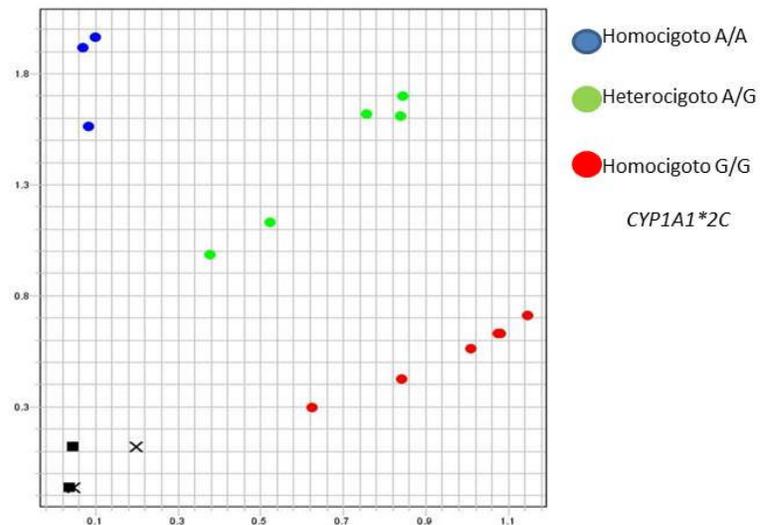


Fig. 29. Superficie de discriminación alélica para CYP1A1*2C.

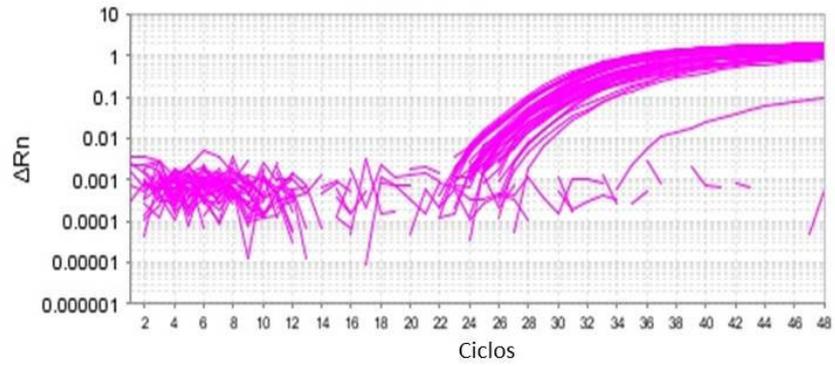


Fig. 30. Curvas de amplificación para *CYP1A1*2C*.

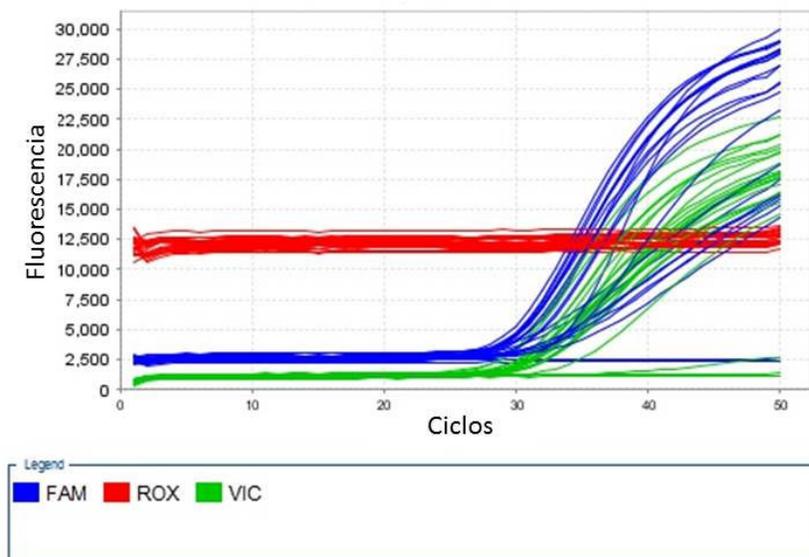


Fig. 31. Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica de *CYP1A1*2C*.

XII.1.1. Discriminación alélica para CYP1A1*4 por tiempo real.

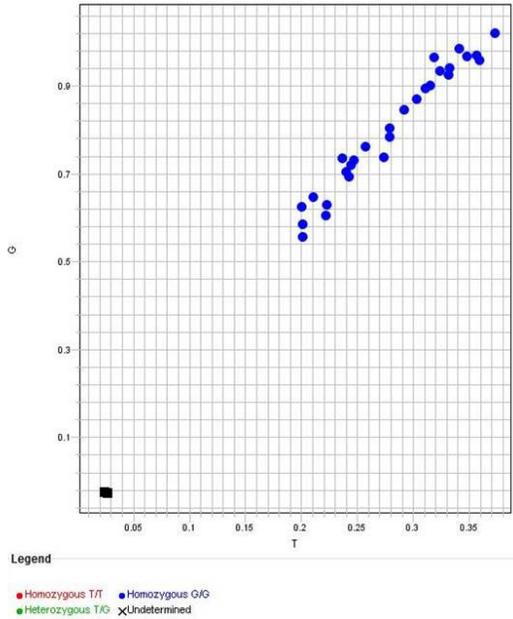


Fig. 32. Superficie de discriminación alélica para CYP1A1*4.

XII.2. Discriminación alélica para EPXH1 HYL*2 por tiempo real.

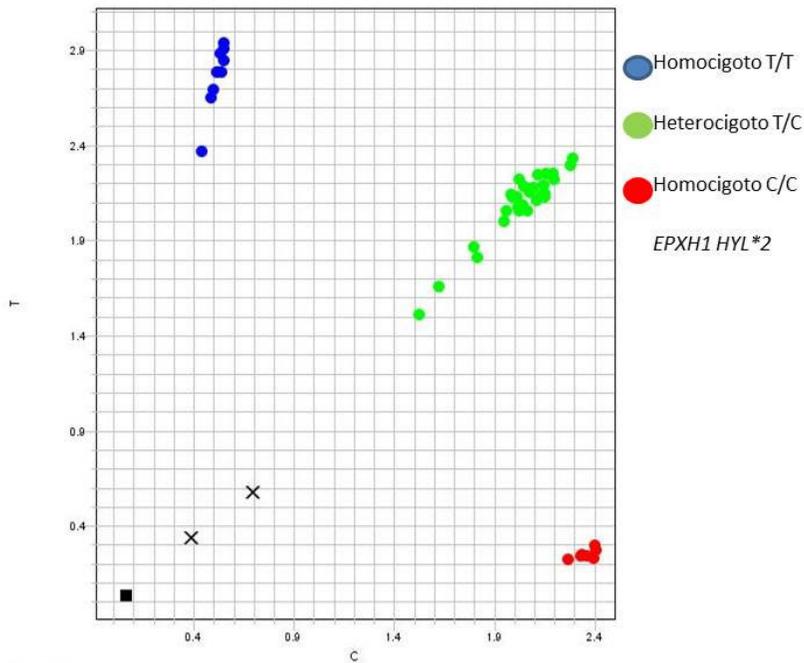


Fig. 33. Superficie de discriminación alélica para EPXH1 HYL*2.

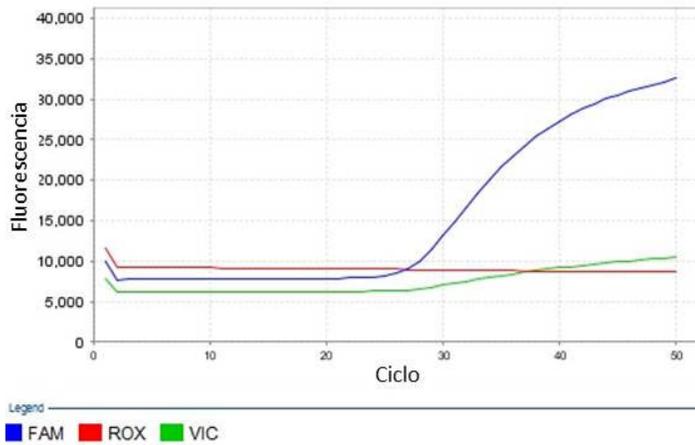


Fig. 34. Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica del homocigoto (T/T) de *EXPH1 HYL**2.

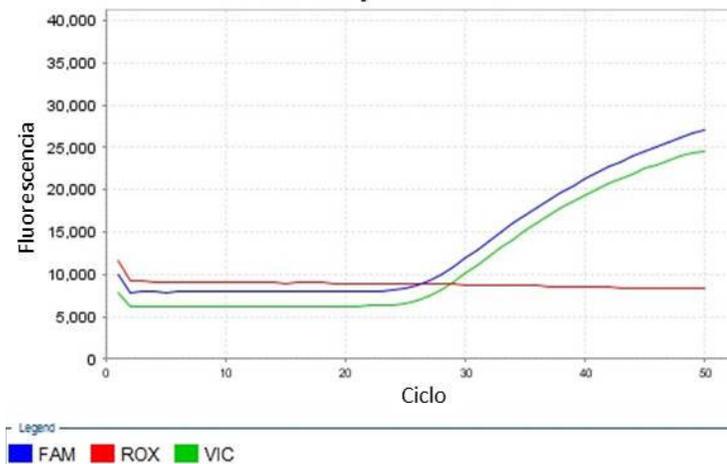


Fig. 35. Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica del heterocigoto (T/C) de *EXPH1 HYL**2.

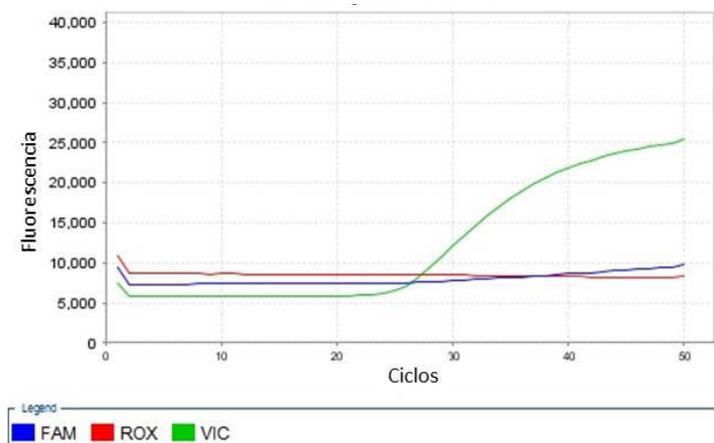


Fig. 36. Diagrama de multicomponentes para discriminación alélica del homocigoto (C/C) de *EXPH1 HYL*2*.

XII.2. Discriminación alélica para EPXH1 HYL*3 por tiempo real.

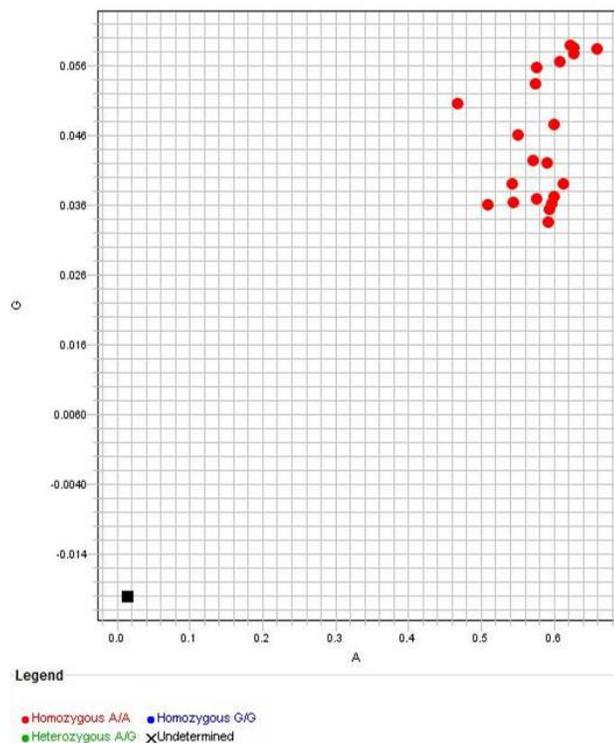


Fig. 37. Superficie de discriminación alélica para *EPXH1 HYL*3*.

XII.3. Detección de la presencia/ausencia de GSTM1 por PCR multiplex.

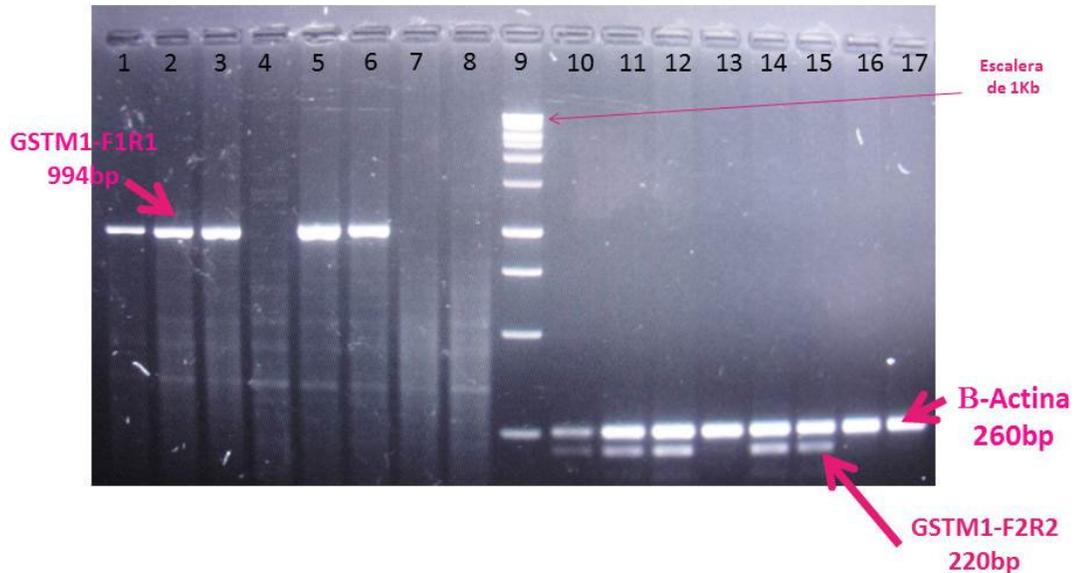


Figura 38. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de PCR de GSTM1 y del gen β -actina. Carriles 1, 2, 3, 5 y 6, GSTM1-F1/R1; carriles 4,7 y 8, GSTM1-F1/R1[delección]. Carril 9, marcador de peso molecular de 1kb. Carriles 10, 11, 12, 14 y 15 GSTM1-F2/R2/ β -actina; carriles 13,16 y 17, GSTM1-F2/R2[delección]/ β -actina.

XII.4. ARTÍCULO PUBLICADO.

Claudia E. Bailón-Soto, Carlos Galaviz-Hernández, Blanca P. Lazalde-Ramos, Daniel Hernández-Velázquez, José Salas-Pacheco, Ismael Lares-Assef, and Martha Sosa-Macías. Influence of CYP1A1*2C on High Triglyceride Levels in Female Mexican Indigenous Tarahumaras. Archives of Medical Research 45 (2014) 409-416.