

# Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología

Ingeniería en Biotecnología



Instituto de Investigaciones en Salud

Universidad de Costa Rica



“Estandarización de una PCR-RFLP para la determinación genética de tres polimorfismos de la enzima paraoxonasa 1 (PON1) en niños costarricenses con leucemia linfocítica aguda”

Tesis sometida a Consideración de la  
Comisión de la Escuela de Biología para  
optar por el título de Ingeniero en  
Biotecnología con el grado académico de  
Bachiller

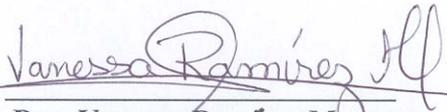
Juan Pablo Morera Rojas

Cartago Abril, 2009

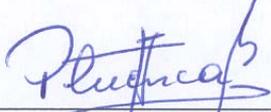
**ESTANDARIZACIÓN DE UNA PCR-RFLP PARA LA  
DETERMINACIÓN GENÉTICA DE TRES POLIMORFISMOS  
DE LA ENZIMA PARAOXONASA 1 (PON1) EN NIÑOS  
COSTARRICENSES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

  
Dra. Vanessa Ramírez Mayorga  
Asesora- INISA

  
Msc. Jhonny Peraza Moraga  
Profesor Asesor-ITCR

  
Dra. Patricia Cuenca Berger  
Lectora

## **Dedicatoria**

A Dios; a mis padres  
y mi hermana; a mi  
novia y amigos por su  
apoyo incondicional  
en lograr este  
proyecto.

Juan Pablo

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Al personal del INISA por su apoyo y dedicación, especialmente a Vanessa Ramírez y Wendy Malespín, gracias por su valiosa guía, confianza y ayuda en todo momento.

Al profesor Jhonny Peraza por su paciencia, consejo y esfuerzo.

A la directora del INISA, la Dra. Patricia Cuenca Berger, por la oportunidad brindada para formar parte de tan importante proyecto.

Y a todos mis amigos y personas que tuvieron siempre una palabra de aliento y positivismo para con mi persona durante el desarrollo de esta tarea.

Muchas Gracias!!

# **Índice**

Dedicatoria .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
Índice.....	4
Resumen.....	6
Abstract .....	7
LISTA DE CUADROS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
ÍNDICE DE ANEXOS.....	10
INTRODUCCIÓN .....	11
REVISIÓN DE LITERATURA .....	12
Leucemias .....	12
Tipos de Leucemias .....	12
Etiología .....	14
Los xenobióticos y el ser humano .....	15
Compuestos organofosforados .....	17
Paraoxonasa (PON).....	18
PCR-RFLP .....	21
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
Análisis de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Lenght Polymorphisms).....	22
Fuentes de ADN.....	23
Justificación .....	24
OBJETIVOS.....	27
METODOLOGÍA.....	27
Población .....	27

Muestras de ADN.....	28
Protocolo de PCR.....	28
Modificaciones al protocolo de la PCR .....	29
Electroforesis en geles de agarosa.....	30
Análisis de los fragmentos de restricción .....	30
RESULTADOS .....	31
Evaluación del Protocolo de PCR .....	31
Modificaciones al protocolo de PCR.....	31
Electroforesis en geles de agarosa.....	32
Análisis de los fragmentos de restricción .....	34
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES .....	42
BIBLIOGRAFÍA .....	43
ANEXOS.....	51

## **Resumen**

La leucemia es el cáncer más común que afecta la niñez costarricense. La leuquemogénesis en niños puede ser explicada por la exposición parental a compuestos cancerígenos como los organofosforados, que son metabolizados por la enzima Paraoxonasa 1 (PON1). Esta enzima varía su actividad y expresión según el ambiente y los polimorfismos. Los más relevantes son Q192R, T108C y L55M. El objetivo del estudio fue la estandarización de un protocolo de PCR-RFLP, para la determinación genética de tres polimorfismos de la enzima PON1 en un grupo de niños costarricenses, cuyos padres fueron expuestos a plaguicidas. Para esta determinación se contó con 90 muestras de ADN provenientes de epitelio bucal de niños. Se probaron dos métodos de obtención de células bucales: por saliva y por cepillo. Se logró normalizar la PCR y se obtuvo la amplificación de los polimorfismos al disminuir el volumen de reacción de la PCR (25µl) en un 40%, aumentar la concentración del ADN a 100ng y adicionar coadyuvantes a la reacción de PCR. Se logró amplificar el ADN de 33% de las muestras de cepillos y de 88% para muestras de saliva después de 77 PCRs., El único polimorfismo sin resultados para las muestras de ADN de la población diana fue T108C, el cual representa 22% del total de la variación en la actividad enzimática, por lo que se hace importante la mejoría del protocolo de PCR. El método de obtención de las células bucales y la adición de coadyuvantes podría jugar un papel importante en el éxito de la amplificación del polimorfismo.

**Palabras clave:** PON1, organofosforados, PCR, epitelio bucal, polimorfismos, leucemias.

## **Abstract**

The Leukemia is the most common cancer in costarrican childhood. Its development in children could be explained by parent exposure to certain agents like organophosphates, metabolized by the enzyme Paraoxonase 1 (PON1). Its expression and activity is modified by the environment and its polymorphisms. The most important are Q192R, T108C and L55M. The work`s objective was a PCR-RFLP protocol standardization, for the genetic determination of the three most common *PON1* polymorphisms in a costarrican children`s group, whose parents were exposed to plaguicides. There were 90 DNA samples, taken from buccal cells from children. Two sample collection methods were tested: by saliva and by cytobrush. The PCR reaction worked when lowing the PCR reaction volume (25µl) in 40%, increasing DNA concentration to 100ng and adding coadjuvants. 33% of the DNA samples from cytobrush and 88% of DNA from saliva samples could be amplified after 77 PCRs. The T108C polymorphism was the only without positive results using children`s DNA. This one is responsible for 22% of arylesterase activity, related to PON1 expression in blood. The collection method and the coadjuvants in the reaction could play a very important role in the amplification percentage.

**Keywords:** PON1, organophosphates, PCR, buccal cells, polimorphisms, leukemia.

# **LISTA DE CUADROS**

<b>Cuadro 1.</b> Características histológicas de las leucemias según la Clasificación FAB.....	13
<b>Cuadro 2.</b> Secuencia de los iniciadores utilizados para los polimorfismos de <i>PON1</i> .....	29
<b>Cuadro 3.</b> Enzimas de restricción, sus temperaturas y fragmentos esperados para el análisis de los polimorfismos en <i>PON1</i> . ....	30
<b>Cuadro 4.</b> Componentes de la mezcla de reacción y perfiles térmicos de PCR para los polimorfismos Q192R, L55M y T108C.....	32
<b>Cuadro 5.</b> Porcentaje de éxito de amplificación de las muestras por PCR según polimorfismo y fuente de ADN.....	33
<b>Cuadro 6.</b> Cantidad y frecuencias genotípicas de los polimorfismos de <i>PON1</i> en estudio dentro de la población diana.....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de desintoxicación del clorpirifos y diazinón mediante el sistema CYP-PON1. ....	18
<b>Figura 2.</b> Gen de la paraoxonasa 1. Vista de exones e intrones. ....	21
<b>Figura 3.</b> Gel de agarosa con productos de PCR para el polimorfismo L55M ....	33
<b>Figura 4.</b> Gel de agarosa con productos de digestión por la enzima Hin1II para el polimorfismo LM55.....	34

# **ÍNDICE DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Método de extracción salina para las muestras de epitelio bucal.....	51
--------------------------------------------------------------------------------------	----

# **INTRODUCCIÓN**

La leucemia es una enfermedad que afecta principalmente a niños en tempranas edades (2-4 años) y representa el 40% de todos los cánceres infantiles del país.

Es producto de la unión muchos factores genéticos y ambientales que pueden alterar procesos bioquímicos relacionados con la hematopoyesis. Según estudios, la aparición de células cancerosas en niños se puede explicar por la exposición de los padres a agentes carcinogénicos como los plaguicidas, específicamente organofosforados. En el País se importa una gran cantidad de estos plaguicidas y son utilizados indiscriminadamente por la industria y el sector agrario. Las personas en general, especialmente los trabajadores de dichas empresas, están sujetos diversas magnitudes y periodos de exposición, que pueden ser peligrosos para el organismo. El compuesto ingresa al cuerpo y es metabolizado por el sistema CYP450 creando un intermediario reactivo, responsable del daño genético. Este intermediario es metabolizado por la enzima PON1, por lo que la rapidez y eficiencia de dicha enzima para convertir el compuesto en agentes inocuos al cuerpo, es de vital importancia para evitar la generación de mutaciones en las células y por lo tanto una posible aparición de leucemia. Partiendo de esta premisa, se hace necesario la caracterización y evaluación del efecto de cada polimorfismo en la secuencia de la enzima PON1, ya que estos determinan el nivel de actividad y concentración de la enzima en la sangre. Esto se logra mediante la utilización de una técnica como la PCR-RFLP. Hasta la fecha no existe ningún trabajo que vincule PON1 con la susceptibilidad a padecer leucemia, por lo que el esclarecimiento de dicha relación es de gran importancia para la creación de un posible plan de prevención que ayude a disminuir el impacto de dicha enfermedad sobre la niñez costarricense. Para lograr dicho cometido se cuenta con muestras de ADN tomadas a partir de células de epitelio bucal extraídas mediante dos métodos distintos: saliva y cepillos. Dichas extracciones fueron realizadas por personal del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) y del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET). El objetivo del proyecto es la estandarización de una técnica de PCR-RFLP a partir de las muestras de epitelio bucal para la posterior determinación de los

polimorfismos más comunes de la población en estudio. El trabajo se realizó en los laboratorios del INISA, ubicados en la Ciudad de la Investigación en San Pedro, San José Costa Rica durante el periodo comprendido entre febrero del 2008 y noviembre del mismo año.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Leucemias**

La leucemia fue evidenciada en 1827 por Velpeau y en 1839 por Barth. Le dieron el nombre de “Enfermedad de la sangre blanca”, sentido que recoge el término proveniente del griego leucos: blanco; y aima: sangre. Fue descrita propiamente por Virchow en Alemania y Benneth en Escocia en el año de 1845 (Monreal *et al.* 2000).

La leucemia es un tipo de cáncer que se caracteriza por una proliferación neoplásica de los glóbulos blancos en la médula o en los ganglios linfáticos, los cuales se encuentran en fases inmaduras (blastos), por lo que su acción defensiva es muy baja, casi nula. Conjuntamente poseen una vida media mayor e interfieren en la hematopoyesis (Monreal *et al.* 2000, Poet *et al.* 2003). Esta pérdida de propiedades en la sangre provoca serias complicaciones en el cuerpo, desde infecciones hasta hemorragias y en muchos casos la muerte. Generalmente se diagnostica mediante un hemograma realizado en la médula ósea y se define por la presencia de más de un 25% de células inmaduras (Soto 2002).

### **Tipos de Leucemias**

Según la Organización Mundial de la Salud, las leucemias se pueden clasificar de la manera más simple, según la línea celular afectada en: linfocítica y mielocítica, y según su evolución en: aguda (inmediata) y crónica (progresiva). A su vez, se puede dividir según la edad en que afecta, obteniendo una subdivisión infantil y otra adulta. Existen distintas clasificaciones según la morfología, citogenética o inmunohistoquímica de los elementos que forman la displasia. La forma más

utilizada de clasificación es la FAB (Franco-Americano-Británico), que se basa en la morfología, análisis histoquímicos, moleculares e incluso el inmunofenotípico de las células cancerosas. Este sistema divide la leucemia en linfoide aguda, mieloide aguda y crónicas: La leucemia linfoide aguda (LLA o ALL) se divide en 3 grupos, siendo la L1 la más común (cuadro 1). La leucemia mieloide aguda (LMA o AML) la divide en 8 grupos (cuadro 1).

La LLA representa el 75-80% de todos los casos de leucemias en niños, se presenta principalmente en edades de 2-4 años. De éstas, la leucemia de linfocitos T es la más común y afecta principalmente varones. Por su parte, la LMA figura con un 15-20% y las leucemias crónicas con un 2-5% (Cohen 1998, Álvaro y García 2001, Soto 2002, Sáenz *et al.* 2003, Belson 2007). (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características histológicas de las leucemias según la Clasificación FAB

TIPOS DE LEUCEMIAS	CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS
<b>Leucemia Linfocítica Aguda</b>	
L1 (85% casos)	Sin nucleolos, baja basofilia, poco citoplasma, cromatina fina con muescas
L2	Igual que L1, más grandes, núcleo irregular, mayor citoplasma, Gaz.
L3 (idénticos a Burkitt)	Vacuolización prominente, citoplasma muy basófilo, cromatina homogénea.
<b>Leucemia Mielocítica Aguda</b>	
M0 (3%)	Mínima diferenciación mieloide (CD13, CD33), sin GAZ ni CA.
M1 (20%) (90% son blastos).	Sin diferenciación. 3% promielocitos. Nucléolo prominente, agranulares.
M2 (30%) (50% blastos)	Con maduración. pro, meta y mielocitos, granulocitos maduros. Gaz y CA.
M3	Progranulocítica. En promielocitos anormales, N varía en forma y tamaño. Bilobulado.
M3 hipergranular	Granulación densa: actividad procoagulante. Muchos CA. Relacionada con CID.

## Seguimiento Cuadro 1

TIPOS DE LEUCEMIAS	CARACTERISTICAS HISTOLOGICAS
<b>Leucemia Mielocítica Aguda</b>	
M4	Mielomonocítica aguda. Eosinófilos con granulación anormal.
M5	Monocítica Aguda. Nucléolo irregular
M5a	80% monoblastos, mucho citoplasma basófilo con pseudopodos. GAZ y vacuolización
M5b	Monoblastos, pro y monocitos. Cit. menos basófilo, gránulos. Se infiltran en piel y encías
M6 (3%)(50% eritroblastos)	Eritroleucemia. mieloblastos(30%), pro mielocitos. Meta y mielocitos y NP en S. periférica
M7 (4%)	Megacarioblástica. Se clasifica por inmunofenotipo. Médula ósea con fibrosis.
CID. Coagulación intravascular diseminada.	
GAZ. Gránulos azurófilos. Cit. Citoplasma.	
CA. Cuerpos de Auer. NP. Neutrófilo Polimorfonuclear	

### Etiología

Evidencias experimentales y epidemiológicas atribuyen la carcinogénesis a una serie de eventos internos y externos al organismo, donde participan la genética, el ambiente y su interacción. La leucemia infantil se explica con dos eventos: a) modificaciones genéticas en el período prenatal; b) modificaciones moleculares en los períodos pre y post-natales mediadas por agentes exógenos como radiaciones, xenobióticos, entre otros. (Monge *et al.* 2002).

Dado que la carcinogénesis se puede explicar por una acumulación de mutaciones en una célula del organismo (proceso que, por lo general, puede conllevar años en efectuarse), se tiende a pensar que la alta incidencia de leucemias infantiles, es el resultante de una exposición parental a compuestos cancerígenos. (Vineis *et al.* 1999). El potencial genotóxico de cualquier compuesto, depende de las

características genéticas de la persona: como la eficiencia para metabolizar xenobióticos, la velocidad de reparación genética, la capacidad de que las células entren en apoptosis cuando existen daños genéticos irreversibles, y de las mutaciones sobre genes que codifican proteínas del ciclo celular (Furlong *et al.* 2005).

Dentro de la etiología de la leucemia, se citan distintos agentes químicos responsables, entre ellos algunos organofosforados (OPs), carbamatos y organoclorados; en su mayoría plaguicidas ampliamente utilizados. Dentro de los OPs se destacan el sarín y el somán (gases nerviosos), el diazoxón, y el clorpirifos oxón (formas reactivas) (Costa *et al.* 1999, Ma *et al.* 2000, Brophy *et al.* 2001, Feychting *et al.* 2001, Meinert *et al.* 2002, Furlong *et al.* 2005, Menegaux *et al.* 2006, Oviedo 2006, Golmanesh *et al.* 2007).

## **Los xenobióticos y el ser humano**

Existe evidencia suficiente para afirmar que la carcinogénesis deriva de la interacción de diversos factores ambientales y genéticos, por lo que su estudio ha sido una prioridad científica en los últimos 50 años. Dentro de los agentes físicos externos al organismo, los plaguicidas representan uno de los compuestos clave, encontrándose diversos estudios que relacionan su exposición con la leuquemogénesis (Hodgson *et al.* 1996, Menegaux *et al.* 2002).

Los organismos poseen enzimas capaces de metabolizar estos compuestos xenobióticos; eliminando o disminuyendo su toxicidad en el sistema. Tanto plaguicidas como sus metabolitos, juegan un rol importante y multifuncional, funcionando como sustratos enzimáticos, iniciadores e incluso supresores de la expresión enzimática (Hogson 1996).

Las rutas metabólicas de los xenobióticos se dividen en dos fases: Fase I de activación y Fase II de desintoxicación, e involucran un sinergismo sistémico de distintos complejos enzimáticos.

## Enzimas de Fase I

- a) Familia citocromo p450 (CYP450), encargada de la oxidación de más del 90% de compuestos exógenos. Realiza una oxidación única. Representa el 80% de todas las enzimas de fase I. Aunque su principal función es la de comenzar el proceso de desintoxicación, también puede producir metabolitos altamente reactivos, que pueden provocar daños en el ADN (Dávila *et al.* 2007).
- b) Familia Flavin-monoxigenasa, de función similar a la familia CYP450. Ocupa el segundo puesto en importancia metabólica. Se encarga de la oxidación o activación de xenobióticos que contienen nitrógeno, azufre, grupos fosfato y aril-aminas, encontradas en organofosforados y en humo de cigarrillo (Hines *et al.* 1993).

## Enzimas de Fase II

- a) Familia glutatión transferasa (GST), la cual participa en la transferencia de glutatión soluble a intermediarios reactivos y elimina electrófilos que atacan macromoléculas (Hodgson 1996, Vineis *et al.* 1999).
- b) Familia acetil transferasas (NATs), las cuales participan en la metabolización de hidracinas y ciertas aminas (Vineis *et al.* 1999, Oviedo 2006).
- c) Familia NADPH quinona oxirreductasa (NQO1), la cual reduce compuestos aromáticos (Vineis *et al.* 1999).
- d) Familia paraoxonasa (PON), que desintoxica los compuestos oxón derivados de la metabolización de los OPs por la familia CYP450. (Hodgson 1996, Poet *et al.* 2003, Sirivarasai *et al.* 2007).

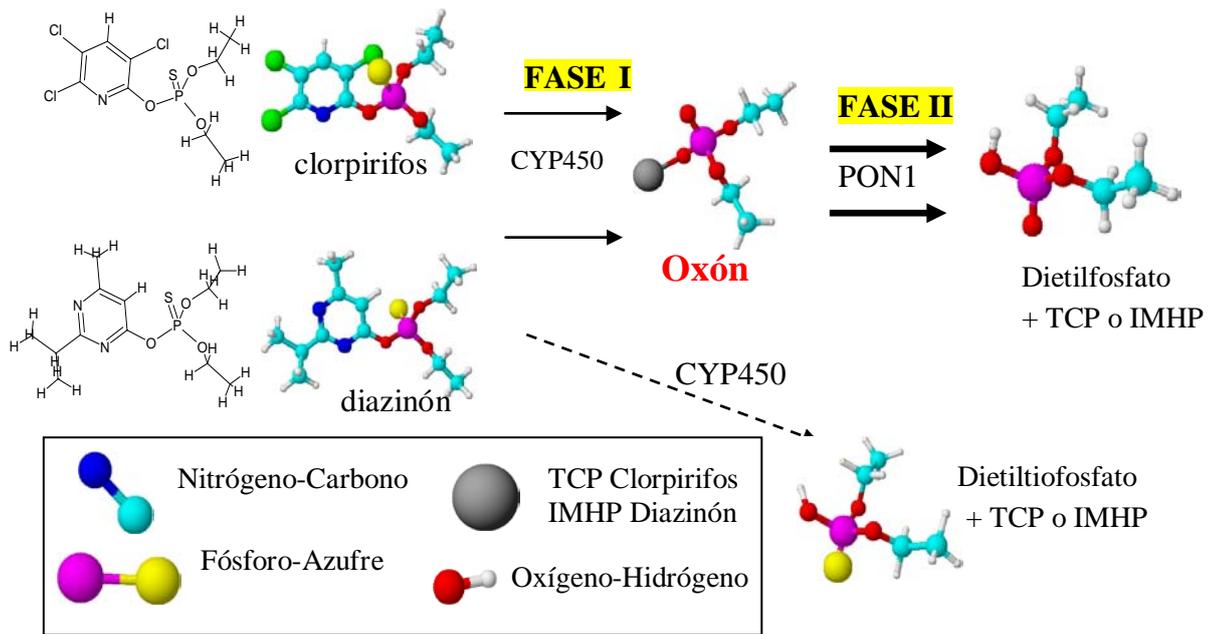
## **Compuestos organofosforados**

Los organofosforados (OP) son los pesticidas más utilizados hoy en día alrededor del mundo. Se utilizan tanto en la industria como en la agricultura. Los compuestos organofosforados fueron sintetizados cerca del año 1800, al reaccionar un alcohol con ácido fosfórico. En 1854 se describió la síntesis de tetraetil pirofosfato y ocho años después un científico alemán investigó su uso como plaguicida. Sin embargo el gobierno alemán dirigió la investigación hacia la creación de armas químicas y agentes nerviosos como el somán y el sarín. En 1941 se introdujeron como insecticidas al mundo (Marrs 2003).

Además de su potencial efecto leuquemogénico (Nanni *et al.* 1996), algunos plaguicidas OPs afectan el desarrollo fetal y reproductivo de los animales, causando malformaciones congénitas, mala calidad seminal, hipogonadismo, etc. (Davies 1996, Dahmani *et al.* 2003). Los OPs se caracterizan por ser fuertes inhibidores de la acetilcolinesterasa (enzima degradadora de acetilcolina; neurotransmisor responsable de la comunicación interneural a nivel sináptico), causando parálisis muscular y nerviosa; además se le atribuyen como síntomas a la exposición crónica, dolores de cabeza, náuseas, hipersecreción, temblores, debilidad, vómito y dolores abdominales (Hodgson 1996, Mathews *et al.* 2002, Poet *et al.* 2003, Sirivasarai *et al.* 2007).

### ***Metabolización de los OPs***

Los sistemas de desintoxicación están compuestos de conjuntos enzimáticos complejos, representando dos fases importantes dentro del ciclo: Fase I y Fase II. Por ejemplo, dentro del mecanismo de fase I de los OPs clorpirifós y diazinón, el sistema CYP450 posee dos opciones: a) la total desintoxicación, resultando en 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) o 2-isopropil-4-metil-6-hidroxipirimidina (IMHP), más dietiltiofosfato, o b) producción del intermediario oxón (forma reactiva del OP, donde el azufre terminal es sustituido por un oxígeno), el cual es posteriormente metabolizado por PON1 a TCP o IMHP, más dietilfosfato (fase II) (Poet *et al.* 2003, Furlong *et al.* 2005); (Figura 1).



Modificado de Furlong. ACD/Chem Sketch 8.17 ©2005.

**Figura 1.** Mecanismo de desintoxicación del clorpirifos y diazinón mediante el sistema CYP-PON1.

## Paraoxonasa (PON)

La familia de enzimas PON, se divide en tres grupos: PON1, PON2 y PON3; que se encuentran ligados al cromosoma 7, en la región q 21.3 y poseen entre sí una homología de 70% de bases nitrogenadas y 60% de aminoácidos. Estas enzimas no presentan un sustrato único; así que su clasificación se basa en los distintos sustratos sobre los que actúan, su distribución en los tejidos, sus propiedades de inhibición y características fisicoquímicas como la movilidad electroforética y el peso molecular (Pasdar *et al.* 2005).

La Paraoxonasa, o PON1, es una enzima que se encuentra en el torrente sanguíneo acoplada a las HDL (High Density Lipoproteins). Está codificada por 9 exones y posee actividad de esterasa. Norman Aldrich (1953) le designó como A-esterasa (Arylesterasa) y seguidamente cambió a su actual nombre, el cual le fue conferido debido a su capacidad para hidrolizar el paraoxón (el metabolito tóxico del insecticida Parathion) a p-nitrofenol (Costa *et al.* 1999, Brophy *et al.* 2001, Furlong *et al.* 2005, Golmanesh *et al.* 2007).

Es una enzima dependiente del calcio, con un tamaño de 43 KDa, formada por 354 aminoácidos, se encarga de catabolizar esteres carboxílicos aromáticos, compuestos organofosforados y lactosas entre otros (Costa *et al.* 1999, Brophy *et al.* 2001, Furlong *et al.* 2005, Golmanesh *et al.* 2007). Pond *et al.* 1995 encontraron que PON1 hidroliza *in vitro* gran cantidad de paraoxón, sin embargo, su actividad no sería lo suficientemente alta para asegurar una protección *in vivo* contra este compuesto en específico (Furlong *et al.* 2002). No obstante, dicho estudio sí encontró actividad protectora de la enzima contra la exposición a clorpirifos oxón *in vivo*.

Dentro de las posibilidades médicas de PON1, podemos destacar su capacidad de hidrolizar g-lactonas-gluocorticoides y esteres ciclo carbonatados, lo cual provee un mecanismo útil para confinar las formas activas de ciertas drogas, asegurando el efecto tisular de las mismas (Biggadike *et al.* 2000, Keam y Perry 2004, Golmanesh *et al.* 2007).

La PON1 es sintetizada en el hígado, y cierta cantidad es secretada hacia el plasma sanguíneo, donde se asocia con las HDL y con la ApoA1. Algunos ensayos *in vitro*, demuestran que esta enzima es capaz de evitar la oxidación de las LDL, reduciendo así la presencia de lípidos oxidados en la sangre, causantes de la arteriosclerosis. Además se ha comprobado su capacidad protectora contra endotoxinas bacterianas (LPS) (La Du B *et al.* 1999, Porat *et al.* 2005, Golmanesh *et al.* 2007).

En humanos la concentración de PON1 en suero varía hasta 13 veces entre individuos. El nivel de variación genética está dado por los distintos polimorfismos encontrados en la secuencia de ADN de la enzima, destacando las variaciones en las regiones codificantes y el sitio promotor, como los lugares clave que pueden afectar la actividad y expresión enzimática. Por otra parte, el ambiente puede causar diferencias también, fenómeno evidenciado por las fluctuaciones poblacionales en la concentración y actividad enzimática sérica que muestran los distintos estudios. Entre los agentes externos responsables de dicho comportamiento destacan la dieta, el nivel de exposición a OPs, el estilo de vida,

entre otros (Clendenning *et al.* 1996, Ferré *et al.* 2004, Oviedo 2006, Sirivasarai *et al.* 2007).

En total se han encontrado 258 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) para PON1. Los más relevantes son:

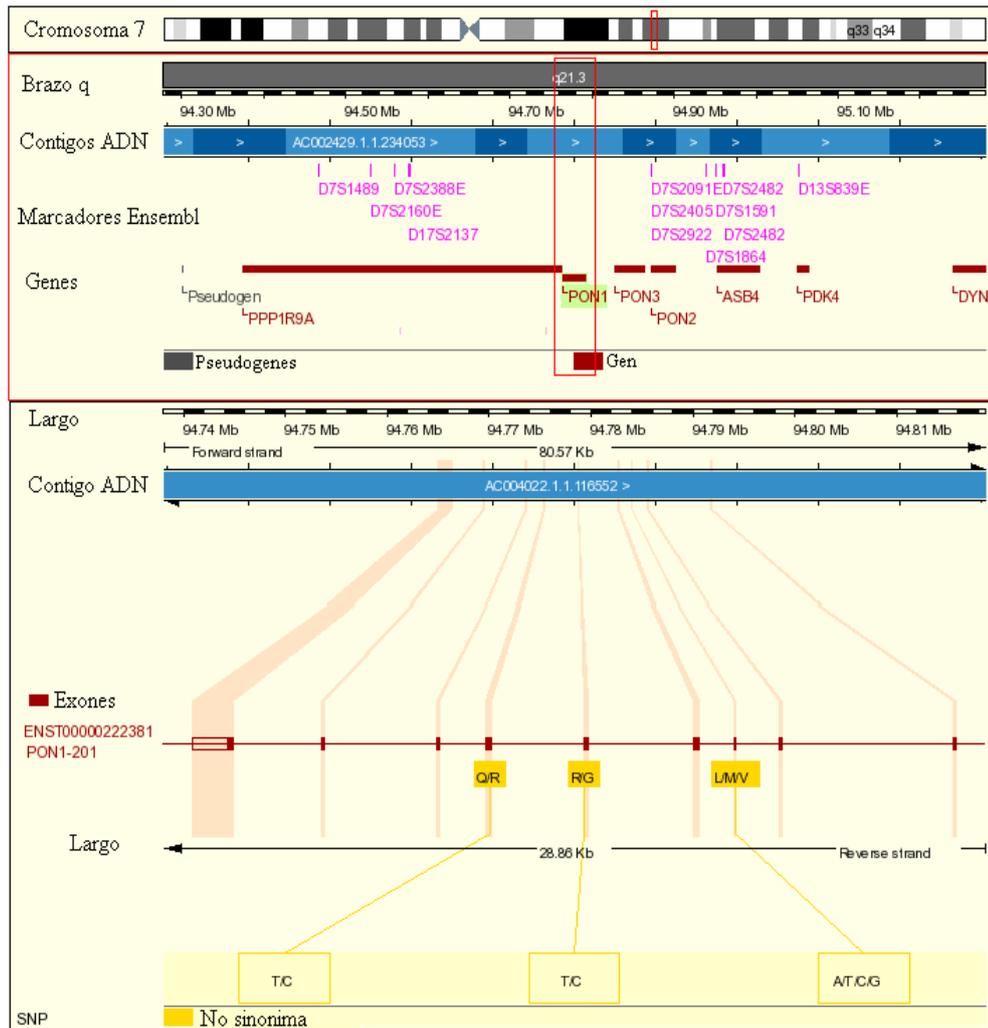
a) Q192R, que representa un cambio de una glutamina (R) por una arginina (Q); en este caso la forma R192 presenta mayor actividad contra el paraoxón y Q192 mayor actividad para somán y sarín.

b) L55M, cambio de una leucina (L) por una metionina (M). La isoforma M55 se relaciona con una baja actividad, en contraposición con L55 que presentan una actividad media en heterocigotos.

c) -108C/T, cambio de una citosina (C) por una timina (T); polimorfismo localizado en el sitio de acople del factor de transcripción SP1. El genotipo C produce doble cantidad de enzima, y según estudios, es responsable del 22% de variación en la actividad enzimática (Brophy *et al.* 2001, Ferré *et al.* 2004, Furlong *et al.* 2005, Pasdar *et al.* 2005); (Figura 2).

Se ha vinculado índices enzimáticos séricos bajos de PON1 con enfermedades como la diabetes mellitus, la hipercolesterolemia, las enfermedades coronarias y la enfermedad de la carótida. Además se evidencia un posible efecto, en conjunto con PON2 y PON3, en el desarrollo de Alzheimer. (Porat *et al.* 2005). Kondo y Yamamoto (1998), relacionaron PON1 con la enfermedad de Parkinson.

Dahmani *et al.* 2003, encontraron relación entre polimorfismos de PON1 y exposición a OPs con malformaciones espermáticas y mala calidad seminal en humanos. El polimorfismo Q192R, homocigota para R (Arginina), brinda una mayor protección contra el daño espermático frente a exposición a OPs, ligado a una menor cantidad de espermios anormales.



Modificado de Ensembl.org Microsoft Paint 5.1 2001

**Figura 2.** Gen de la paraoxonasa 1. Vista de exones e intrones.

## PCR-RFLP

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction* (*PCR*)), es una de las técnicas más utilizadas en el campo de la biología molecular. Debido a su alta especificidad y sensibilidad, la PCR es muy ventajosa en el diagnóstico de virus, parásitos y bacterias de difícil cultivo. Ésta permite la rápida generación de una gran cantidad de ADN en muy poco tiempo. La principal función atribuible a la PCR, es su capacidad para amplificar una región

específica, que al encontrarse en cantidad suficiente, facilita su observación y análisis (Premoli *et al.* 2004, Clark 2005).

Existen diversos tipos de PCR, como la PCR estándar, la Long PCR, y la PCR múltiple. La PCR estándar involucra la amplificación de un solo fragmento de ADN de menos de 5kb (kilobases); resulta muy útil para una gran variedad de aplicaciones como clonación y detección de mutaciones entre otras. Puede estar acompañada de otras técnicas y variaciones de la misma como DOP-PCR, REP-PCR, RFLP-PCR, Nested-PCR, PCR-SSCP, In situ PCR, Megaprimer-PCR, etc (Clark 2005).

La Long PCR es utilizada para amplificar un solo fragmento desde 5kb hasta 40kb. Se aplica en secuenciación extensiva, inserciones o deleciones largas y moléculas recombinantes (Clark 2005).

La PCR múltiple se utiliza para la amplificación de varias secuencias a la vez de 5kb o menos; se aplica en análisis de ligamiento, estudios forenses, diagnósticos genéticos entre otras (Clark 2005).

### **Análisis de los fragmentos de restricción (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphisms)**

Existen dos tipos de enzimas de restricción:

#### 1. Tipo I

La enzima está conformada por tres subunidades; una que reconoce una secuencia (Hsd S); por lo general a miles de pares de bases del sitio de reconocimiento. Otra que metila el sitio (Hsd M) y una tercera que corta en el lugar de interés (Hsd R). Son enzimas que trabajan una vez y se inactivan (Clark 2005).

#### 2. Tipo II

La enzima corta en un lugar intermedio de la secuencia de reconocimiento. Estas son las más utilizadas en ingeniería genética. Estas enzimas son

palindrómicas, lo que significa que reconocen ambas cadenas, generando extremos pegajosos o extremos romos (si cortan en un único lugar ambas cadenas). Reconocen desde 4 hasta 41 nucleótidos aproximadamente (Clark 2005, Vector NTI 2006).

Si dos moléculas de ADN relacionadas son cortadas con la misma enzima de restricción y ambas difieren en un nucleótido reconocido o no por esta enzima, la molécula resulta en fragmentos de diferente tamaño para cada individuo, esta diferencia en la longitud de los fragmentos de restricción es lo que se conoce como RFLP (Griffiths 2002, Clark 2005). Para visualizar estas diferencias entre individuos, se utiliza la electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa.

En contraste con la agarosa, la poliacrilamida permite una mayor resolución, sin embargo los costos y el tiempo invertido son mayores, además es cancerígena. Es utilizado para discriminar secuencias de hasta 1bp de diferencia. Los geles de agarosa son los más utilizados para el análisis de polimorfismos y otros cambios en los genes (Brito 2003).

## **Fuentes de ADN**

Tradicionalmente el ADN utilizado para análisis genéticos ha sido extraído de linfocitos o de sangre completa, ya que la sangre dispone de una gran cantidad de células, brinda ADN de buena calidad e información clave sobre diversos agentes fisiológicos importantes para otro tipo de estudios (Cozier *et al.* 2004). Sin embargo, el método de recolección de la muestra resulta bastante costoso en tiempo, dinero y proceso, ya que necesita de movilización de personal capacitado para la extracción de sangre del participante, recipientes especiales e inyectables. A esto se suma el carácter invasivo de dicho método, por lo que muchas personas prefieren no participar en un estudio de este tipo, ya sea por asuntos personales o padecimientos que dificulten la toma de la muestra.

La utilización de muestras de epitelio bucal y saliva es de gran utilidad para los estudios a gran escala, destacando su facilidad de recolección y su alta aceptabilidad por parte de las personas (Hansen *et al* 2007).

Un estudio realizado por Hansen *et al.* (2007) concluye que existe una respuesta muy baja para la recolección de muestras de sangre (31%). Tomando en cuenta que las participantes del estudio fueron enfermeras y realizaron su propia extracción sanguínea, el porcentaje podría ser aún más bajo en la población en general.

Debido a estas y otras razones es importante la implementación de otros métodos menos invasivos, específicamente la utilización de células de epitelio bucal. Los procedimientos para su recolección son muy variados y a su vez difieren en calidad y cantidad de ADN humano recuperado. Generalmente el material celular se recolecta por medio de cepillos, retractores de lengua, papel filtro, aplicadores, enjuagues bucales o saliva (Moore *et al.* 2001, Sigurdson *et al.* 2005, Aidar & Line 2007, Hansen *et al.* 2007).

La cantidad de ADN disponible varía según el método de recolección celular y el método de extracción de ADN. En caso de utilizar enjuague bucal como método de recolección, éste puede brindar hasta 27 veces más ADN que otros métodos, sin embargo, la tasa de amplificación para dichas muestras ha mostrado alcanzar valores muy bajos (Lum & Marchandan 1998, Moore *et al.* 2001).

## **Justificación**

En Costa Rica, la leucemia infantil es el cáncer más común que enfrenta la sociedad, representa el 41% de todos los tumores infantiles y a nivel mundial ocupa uno de los puestos más altos de incidencia (con una tasa de incidencia promedio estandarizada por edad de 56 por millón persona por año) (Oviedo 2006, Monge *et al.* 2002). En infantes, la leucemia linfocítica aguda, es la más común en el período de 2-4 años de edad. La presencia de células carcinógenas en niños, sugiere la exposición parental a agentes carcinogénicos como campos electromagnéticos, infecciones, el fumado, drogas, o agentes químicos fuertes como los plaguicidas. Dichos padres poseen una mayor probabilidad de concebir un hijo con alta predisposición a la leucemia, presentando puntos de alto riesgo en fase prenatal y postnatal (Lowengart *et al.* 1987; Meinert *et al.* 2000; Petridou & Dessypris 2000; Monge *et al.* 2002; Menegaux *et al.* 2006; Monge *et al.* 2006).

En el País se introduce una cifra considerable de plaguicidas, la cual ascendió a 14 000 toneladas de ingrediente activo para el período del 2004, colocándolo así en los primeros lugares del mundo en importaciones de biocidas y elevando el riesgo potencial de exposición química, de personas que trabajan en oficinas, encargados de transporte, vecinos, agricultores, consumidores, fauna y flora en general (Davies *et al.* 1996, Wesseling y de la Cruz 2006).

Existe evidencia suficiente que respalda la acción activa y eficiente de la enzima PON1 contra los OPs en intoxicaciones y agentes causantes de arteriosclerosis. Sin embargo, no existe estudio hasta la fecha que haya relacionado la actividad de PON1 con el desarrollo de leucemias en personas expuestas a plaguicidas, por lo que su estudio es un paso muy importante dentro de la etiología y prevención de la leucemia.

Se ha comprobado que sujetos con bajo nivel de PON1 en suero, son más sensibles contra la exposición a organofosforados. Estudios realizados en ratones sin el gen PON1, muestran que estos presentan lesiones arterioscleróticas y una muy baja tolerancia a los OPs. Son cinco veces más sensibles a la inhibición de la colinesterasa por el diazoxón y el clorpirifos oxón. El suministro de PON1 purificada, 30 horas antes de la exposición a OPs, vía intravenosa e intermuscular, aumenta la resistencia y tolerancia de los ratones (Costa *et al.* 1999, Brophy *et al.* 2001, Furlong *et al.* 2005, Golmanesh *et al.* 2007).

Según diversos estudios, la concentración de PON1 en el seno materno es muy baja, alcanzando sus niveles normales a los 6-15 meses, así que es razonable asumir el peligro inminente en el que se encuentran los fetos con respecto a las pequeñas, casi nulas exposiciones de la madre al tipo de químicos metabolizados por la PON1 (Furlong *et al.* 2005).

La exposición del feto vía materna a contaminantes químicos, resulta en riesgo aumentado de generar cáncer, y el 80% de los mismos, se atribuye a labores diarias e industriales (30 compuestos con actividad cancerígena en la industria costarricense, entre ellos los cromatos y el bis-2-cloroetil). Se asegura que el 70%

de los cánceres se podrían prevenir si los factores de riesgo y de protección pudiesen ser detectados (Morales 1997, Ames 2003).

El desarrollo de pruebas de mutagenicidad ha sido esencial para identificar correctamente los agentes genotóxicos; información que permite un diagnóstico temprano o la prevención del cáncer evitando las exposiciones a los mismos cuando exista la posibilidad de hacerlo, como en el caso del fumado.

El Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), realizó un estudio que relaciona el riesgo de desarrollar leucemia ante la exposición a plaguicidas (Monge *et al* 2007), por lo que la investigación conjunta con el Instituto de Investigaciones en Salud brinda una gran oportunidad para esclarecer un poco la etiología de la leucemia infantil en niños costarricenses. Es posible estudiar la susceptibilidad a desarrollar leucemias caracterizando genéticamente a los grupos expuestos en algunos genes claves que participan en estos procesos. El trabajo a realizar se hará conjuntamente con el análisis de otros genes por parte del INISA. Es de gran importancia la implementación de una técnica capaz de clasificar la población según su susceptibilidad dada por el genotipo particular. La técnica de PCR-RFLP es una técnica bastante concisa y exacta, su normalización es necesaria para la determinación genética de tres polimorfismos de la enzima paraoxonasa 1 (PON1) en niños costarricenses con leucemia linfocítica aguda.

# **OBJETIVOS**

## **Objetivo general**

Estandarizar un protocolo de PCR-RFLP, para la determinación genética de tres polimorfismos de la enzima PON1 en un grupo de niños costarricenses, cuyos padres fueron expuestos a plaguicidas.

## **Objetivos específicos**

1. Comparar la viabilidad entre las distintas fuentes de ADN utilizadas para la caracterización genética por PCR.
2. Identificar los polimorfismos más comunes en la población diana mediante la técnica de PCR-RFLP.

# **METODOLOGÍA**

## **Población**

Corresponde a una población de estudio del proyecto: “Exposición ocupacional de padres y madres a plaguicidas y cáncer en los hijos: tumores cerebrales y leucemia en niños” inscrito en la UNA bajo el código N° 022218, y aprobado por el Comité Ético Científico del Hospital Nacional de Niños bajo el No. 018-2000 y por el Ministerio de Salud como el protocolo 00-29.

Está conformada por 90 muestras: 40 niños con leucemia (0-14 años) diagnosticados en el período comprendido entre el 1 de enero de 1995 hasta el 31 de diciembre del 2000, los cuales fueron identificados del Registro Nacional de Tumores (RNT) de Costa Rica y el Hospital Nacional de Niños (HNN); y 50 controles poblacionales (0-14 años) seleccionados de la base de datos del Registro Civil alrededor de todo el País.

## **Muestras de ADN**

Para el estudio de marcadores biológicos se contó con 90 muestras de ADN extraídas de epitelio bucal de niños (ADNe), 16 muestras de ADN de saliva (ADNs) de los investigadores del INISA y 4 muestras de ADN de sangre periférica (ADNp) como controles positivos. Las muestras de epitelio bucal fueron extraídas en los años 2002 y 2003, mediante la utilización de cepillos; las muestras de saliva se obtuvieron en abril del 2008. El ADN fue aislado mediante un método de extracción con sales por parte del personal técnico del INISA (Anexo 1) (Morales 2008). Dicha extracción se realizó en el período comprendido entre noviembre del 2007 y abril del 2008. Las muestras de sangre se extrajeron por medio del método fenol-cloroformo modificado de Blin & Stafford (1976).

## **Protocolo de PCR**

Para la realización de la técnica de PCR se contó con tres pares de iniciadores, específicamente diseñados para la amplificación de una región del gen *PONI* (Cuadro 2). Para los polimorfismos dentro de las regiones codificantes: Q192R y L55M, se aplicaron inicialmente las condiciones expuestas en Campo *et al.* 2004. Brevemente describen la utilización de una mezcla de reacción de 25µl con 10ng de ADN (En la literatura se utiliza 150ng por reacción de PCR), 200µM de cada dNTP, 400nM de cada imprimador, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5µl buffer 10X (100mM Tris-HCl pH9, 500mM KCl, 1% Tritón X-100) y 2U de Taq Polimerasa . Para el polimorfismo en la región promotora: T108C, se aplicaron las condiciones expuestas en Brophy *et al.* 2001, que utilizan una mezcla de reacción de 15µl con 10ng<sup>a</sup> de ADN, 200µM de cada dNTP, 250nM de cada imprimador, 1.5µl buffer 10X, 0.5% DMSO, 2mM MgCl<sub>2</sub> y 2U de Taq polimerasa.

**Cuadro 2.** Secuencia de los iniciadores utilizados para los polimorfismos de *PON1*.

<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Polimorfismo</b>
QR1	TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG	Q192R
QR2	CCTGAGAATCTGAGTAAATCCACT	
LM1	CCTGCAATAATATGAAACAACCTG	L55M
LM2	TGAAAGACTTAAACTGCCAGTC	
TC1	GACCGCAAGCCACGCCTTCTGTGCA	T108C
TC2	TATATTTAATTGCAGCCGCAGCCCTGC TGGGGCAGCGCCGATTGGCCCGCCGC	

El tamaño del iniciador TC2, de 53bp, se debe a la necesidad de la creación de un sitio de restricción para la enzima Bsh1236, lo que se logra añadiendo una base en la secuencia de reconocimiento. Este representa uno de ocho errores de coincidencia añadidos (Coyne *et al.* 2001, Clark 2005). Cuando la enzima reconoce el sitio, se generan fragmentos de 52bp y 67bp, que indican el genotipo del individuo.

### **Modificaciones al protocolo de la PCR**

#### ***Polimorfismos Q192R y L55M***

Para ambos polimorfismos se realizó un gradiente de concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1,1.5, 2,2.5 mM; un gradiente de temperatura de alineamiento entre 55-65°C para Q192R y entre 58-68°C para L55M; y un gradiente de concentración de ADN de 20-40-60-80-100 ng. Se disminuyó el volumen de la reacción de 25µl a 15µl. Se adicionó BSA en glicerol y se aumentó la concentración de los iniciadores de 200nM a 1mM. Finalmente se cambió la solución tampón de PCR y el MgCl<sub>2</sub> por la solución tampón 11X ( (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (11mM), EDTA(4,4mM), 2-Mercaptoetanol (2-ME) (6,7mM), BSA (113µg/ml), Tris-HCl (45mM), MgCl<sub>2</sub> (4,5mM) y los dNTPs (1mM)).

#### ***Polimorfismo T108C***

Para este polimorfismo se cambió la cantidad de ADN a 100ng y se realizó un gradiente de temperatura entre 58-68°C. Se incrementó la concentración de

DMSO de 0,5% a 1%. Finalmente se cambió la solución tampón de PCR y el MgCl<sub>2</sub> por la solución tampón 11X.

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Seguido de la reacción de PCR, se comprobó la amplificación mediante la corrida de los productos en un gel de agarosa (Fermentas) al 1.5%, por 45min a 100V. Se utiliza 5µl del producto de PCR más 3µl de la solución de carga.

### **Análisis de los fragmentos de restricción**

Posterior a la comprobación de la amplificación, se realizó una digestión enzimática para la determinación del patrón de bandas esperado según el genotipo. Se utilizó 11µl del producto de PCR, se incubó durante toda la noche con 5 U de la enzima específica y 1-2 µl de solución tampón (Cuadro 3). Se montó las digestiones en un gel de agarosa Fermentas Top Visión al 4% a 100V por cerca de 80min.

**Cuadro 3.** Enzimas de restricción, sus temperaturas y fragmentos esperados para el análisis de los polimorfismos en *PONI*.

<b>Polimorfismo</b>	<b>NCBI</b>	<b>Enzima</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Fragmentos</b>
Q192R	rs662	BspPI	55°	172-66
L55M	rs854560	Hin1II	37°	106-66
T108C	rs705379	Bsh1236I	37°	52, 67

(NEB 2008)

# **RESULTADOS**

## **Evaluación del Protocolo de PCR**

Cuando se probó el protocolo, tal y como se describe en la literatura (Brophy *et al.* 2001, Campo *et al.* 2004) utilizando 20ng de ADN, no se logró amplificar los polimorfismos de interés para ninguna de las muestras.

## **Modificaciones al protocolo de PCR**

### ***Polimorfismos Q192R y L55M***

Se realizaron 63 PCRs para ambos polimorfismos: 26 para el polimorfismo Q192R y 37 para L55M. Estos se realizaron con el fin de evaluar las condiciones de reacción. Con 15µl de mezcla de reacción y a una concentración de 80 y 100ng, se obtuvo la amplificación de las muestras de ADNp. Se sustituyó la solución tampón de PCR y el MgCl<sub>2</sub> por la solución tampón 11X y se aumentó la concentración de iniciadores a 1mM. Esto resultó en la amplificación de las muestras de ADNe, ADNs y ADNp.

### ***Polimorfismo T108C***

Se realizaron 14 PCRs. Se adoptaron las condiciones aplicadas para los polimorfismos Q192R y L55M, con la excepción del aumento de iniciadores en la reacción. Únicamente amplificaron las muestras de ADNp y ADNs.

Durante el transcurso de la evaluación, se valoraron todos los reactivos utilizados para eliminar posibilidad de contaminación y vencimiento.

Las condiciones para las PCRs después de su normalización se resumen en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Componentes de la mezcla de reacción y perfiles térmicos de PCR para los polimorfismos Q192R, L55M y T108C.

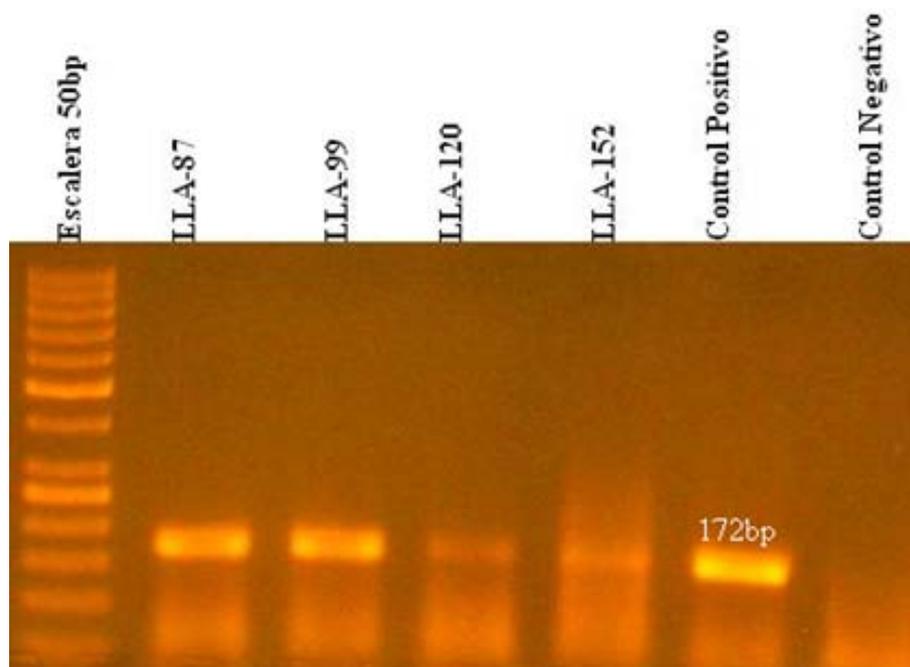
<b>Mezcla de reacción</b>	<b>Q192R</b>	<b>L55M</b>	<b>T108C</b>
Iniciadores	400nM	400nM	250nM
ADN	100ng	100ng	100ng
Solucion 11X	1,5µl	1,5µl	1,5µl
Taq Polimerasa	2U	2U	2U
DMSO	-	-	1%
Volumen total	15µl	15µl	15µl
<b>Perfil Térmico</b>			
Desnaturalización Inicial			
94°C	3min	3min	2min
Ciclos	35	35	25
Desnaturalización 30s	95°C	95°C	94°C
Alineamiento 20-30s	60°C	63°C	63°C
Extensión 72°C	50s	50s	30s
Extensión Final 72°C	10min	10min	2min

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Según el análisis de los geles de agarosa, la PCR amplificó para un 88% de las muestras de ADN, un 100% para las muestras de ADNp; y aproximadamente 36% para ADNe, de las cuales 62% son controles y el otro 38% son casos (Figuras 3 y 4). El porcentaje de éxito de amplificación se muestra en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Porcentaje de éxito de amplificación de las muestras por PCR según polimorfismo y fuente de ADN

Fuente	Numero de Muestras								
	Q192R			L55M			T108C		
	+	-	%	+	-	%	+	-	%
ADNs	14	2	88%	14	2	88%	6	10	38%
ADNe	32	58	36%	26	64	29%	0	90	0%
ADNp	4	0	100%	4	0	100%	4	0	100%

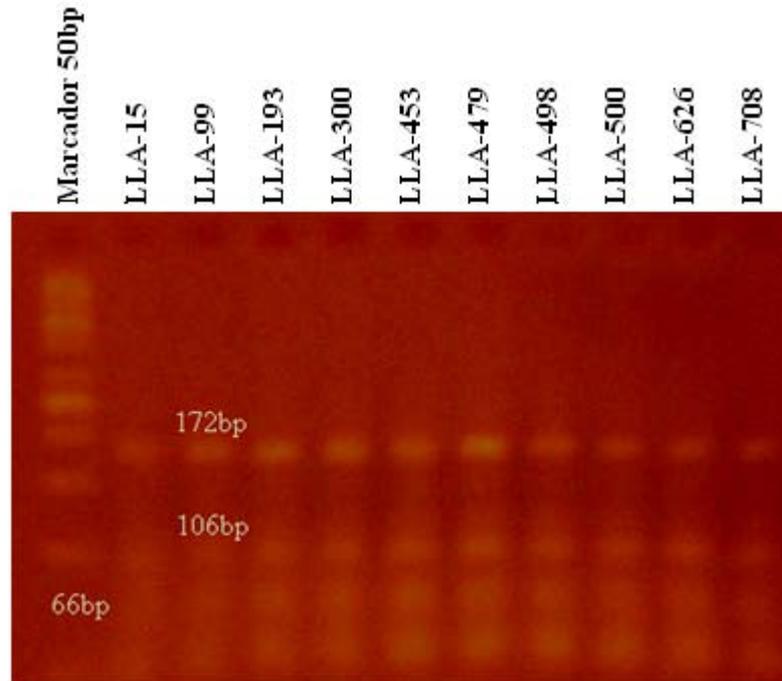


**Figura 3.** Gel de agarosa con productos de PCR para el polimorfismo L55M

El consecutivo LLA que se encuentra en la figura 3, pertenece a la numeración dada a las muestras de ADN provenientes de raspado bucal de células epiteliales de niños. El control positivo utilizado para las PCRs fue de sangre.

## Análisis de los fragmentos de restricción

Todas las muestras que amplificaron pudieron ser genotipadas (Figura 4).



**Figura 4.** Gel de agarosa con productos de digestión por la enzima Hin1II para el polimorfismo LM55.

Las frecuencias genéticas para el grupo de ADNc: casos y controles para leucemia, se muestran en el cuadro 6.

**Cuadro 6.** Cantidad y frecuencias genotípicas de los polimorfismos de PON1 en estudio dentro de la población diana.

Polimorfismo	Casos			Controles		
	AA	AG	GG	AA	AG	GG
<b>Q129R*</b>						
<i>N. Individuos</i>	12	0	0	20	0	0
<i>F. genotípica</i>	1	0	0	1	0	0
<b>L55M**</b>	<b>TT</b>	<b>TA</b>	<b>AA</b>	<b>TT</b>	<b>TA</b>	<b>AA</b>
<i>N. Individuos</i>	2	6	0	2	18	0
<i>F. genotípica</i>	0,30	0,80	0	0,10	0,90	0

\*Es un cambio de una adenina (A) por una guanina (G).

\*\*Es un cambio de una Timina (T) por una adenina (A).

Las frecuencias son bastante homogéneas entre los controles y los casos. Ambas distribuciones no cumplen el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $X^2 = 13.81$ ).

## **DISCUSIÓN**

La investigación muestra que la tasa de éxito para la PCR realizada con muestras de ADN extraídas de sangre es de 100%, 88% para las muestras de saliva y 34% para las muestras extraídas de epitelio bucal por método de cepillos. Resultados muy comparables con los obtenidos por Hansen *et al.* (2007), donde la tasa de éxito para la PCR realizada con las muestras de ADN extraídas de sangre es de 100%; 84% para las muestras de saliva y 23% para las muestras extraídas de epitelio bucal por método de cepillos. Este comportamiento puede explicarse por la cantidad y calidad de ADN de las muestras. Según estudios realizados utilizando el método de hibridación, se ha logrado cuantificar la cantidad de ADN humano disponible en las muestras extraídas a partir de epitelio bucal, ya que al ser muestras de origen bucal, pueden contener además ADN bacteriano. Se ha encontrado una disponibilidad del 49-68% de ADN humano en muestras de saliva, en contraste con las muestras tomadas utilizando cepillos, donde el ADN útil se acerca al 11%, por lo que existe poco ADN disponible para ser amplificado. (García *et al.* 2001, Rylander *et al.* 2006).

Se sabe que en la saliva existe una variación muy alta en cuanto a la cantidad de ADN disponible. En una extracción se puede hallar en promedio 27.5 µg de ADN humano por muestra (García *et al.* 2001, Rylander *et al.* 2006). Utilizando enjuagues bucales se ha encontrado en promedio 21 µg por muestra (Feigelson *et al.* 2001). Y entre lo más relevante, utilizando el material extraído a partir de dos cepillos, se ha encontrado un promedio de 1,6 µg de ADN humano en muestras de epitelio bucal (García *et al.* 2001). Si se toma en cuenta que el protocolo incluido en la literatura requiere de al menos 100ng para lograr la amplificación, y que el volumen final de resuspensión de la muestra es de 50, la concentración de ADN humano final (32ng/ µl) no sería lo suficiente como para asegurar una

amplificación exitosa, salvo aquellos casos donde el ADN se coloque en  $\mu\text{g}$  por muestra.

La presencia de ADN humano útil en las muestras pudo verse comprometido por las condiciones de almacenaje, que podría eventualmente facilitar el crecimiento de bacterias, aumentar la cantidad de inhibidores de la PCR y acelerar la degradación del ADN. Si se toma en cuenta que las muestras de epitelio bucal de niños fueron extraídas en el lapso 2002-2003, se puede asegurar que dichas desventajas pasaron a ser significativas. La concentración de ADN obtenida a partir de epitelio bucal de las distintas fuentes, se debe a su capacidad de extraer células. En muchos casos pudo haber ocurrido una mala toma de muestra; en el caso de los cepillos, la extracción pudo no haber sido realizada con la suficiente fuerza como para obtener la cantidad de células necesarias (Walter *et al.* 1999).

Dentro de una PCR los factores que pueden afectar el éxito de la amplificación son numerosos. Entre ellos destaca la cantidad de reactivos añadidos por reacción, las características del sitio por amplificar, los iniciadores utilizados, la pureza de las muestras y la cantidad de ADN.

Para los polimorfismos Q192R y L55M, los iniciadores utilizados poseen una similaridad del 97%, una longitud de 20-22bp y un contenido de G/C de 39 y 46%, valores encontrados dentro de los parámetros establecidos para lograr una amplificación exitosa. Además no son complementarios entre sí y presentan una alta especificidad. En el caso del polimorfismo T108C, se aplicaron las mismas condiciones de PCR para los otros polimorfismos, sin embargo, no logró amplificación alguna para las muestras de ADN. Ambos iniciadores contienen un 64-67% de G-C, y el TC2 posee 53bp, lo cual excede lo recomendado (20-25bp y 40-60% G/C) (Bartlett & Stirling 2003).

Para que dicho iniciador realice su trabajo, necesita de una alta disponibilidad de ADN molde. El cambio realizado en la concentración de ADN y el volumen de reacción, resultó en una mayor disponibilidad de cadenas molde. Esto sumado al aumento en la concentración de los iniciadores, pudieron generar un ambiente

propicio para la óptima amplificación del fragmento diana en muestras de sangre y de saliva fresca, y no para las muestras de ADN.

Debido a la posibilidad de una baja concentración y/o calidad de ADN humano en las muestras, se resolvió añadir diversos coadyuvantes para incrementar la acción de la polimerasa, desplazar agentes contaminantes y mejorar el ambiente de la reacción. Existen muchas soluciones tampón recomendadas para PCR difíciles o con iniciadores con alto contenido en G-C, como en el caso de T108C. La solución tampón 11X es utilizada con mucho éxito en la amplificación de este tipo de PCR, como es el caso de la amplificación de genes relacionados con la distrofia muscular (Morales 2008, Ralser *et al.* 2006, Vanden 2008). La composición de la solución tampón 11X es bastante compleja, y cada componente cumple una función específica, lo que brinda a esta solución cualidades de trabajo únicas. Entre sus componentes destacan el sulfato de amonio, el EDTA, el 2-Mercaptoetanol, el BSA, el Tris-HCl y el MgCl<sub>2</sub>. El 2-ME tiene como función principal evitar la oxidación de la ADN polimerasa, reduce los puentes disulfuro creando enlaces -SH. Estos enlaces se pueden formar en el sitio activo de la enzima, por lo que este agente reductor destituye dichos enlaces habilitando la acción enzimática. Esto aumenta la vida media y la actividad de la ADN polimerasa. (Rybicki 2008, Berg *et al.*). El BSA se utiliza para recubrir las superficies y así evitar la adhesión de la polimerasa a las paredes de los recipientes, logrando mantener una alta cantidad en la reacción. También puede unirse a ciertos inhibidores de la PCR, mejorando la reacción (Al-Soud & Rådström 2000, Henegariu *et al.* 1997). El (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> incrementa la fuerza iónica de la reacción, que altera la temperatura de desnaturalización y alineamiento del ADN y estimula la actividad enzimática. Permite el acoplamiento de los iniciadores, inclusive si la temperatura de alineamiento no es la exacta, o si el iniciador no calza totalmente como en el caso de TC2. También remueven ciertos agentes inhibidores, como el exceso de pirofosfato (Müller 2008, Rybicki 2008, Van Pelt-Verkuil 2008).

El Mg<sup>2+</sup> es quelado por los nucleótidos y forma parte de la estructura de ADN. Una gran cantidad de este catión produce puentes de hidrogeno más fuertes en el

ADN y es utilizado por la ADN polimerasa para la síntesis genómica (Müller 2008). Las altas concentraciones del  $MgCl_2$  son muy importantes en la PCR cuando se utiliza la solución tampón 11X, ésta contiene EDTA, el cual es un agente quelante de iones metálicos divalentes como el  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  y el  $Fe^{2+}$ , que pueden servir de cofactores para ciertas exonucleasas. Una baja concentración de EDTA permite una concentración óptima de  $Mg^{2+}$  y elimina en gran grado la presencia de estos iones, los cuales pueden intervenir en la PCR (Oviedo & Rodríguez 2003, Khosravinia & Ramesha 2007, Müller 2008).

El DMSO es muy utilizado en reacciones con iniciadores de alto contenido en G-C. Por esta razón se agrega a la PCR del polimorfismo T108C, ya que posee un 64% de G-C en su estructura. Sin embargo se puede hacer uso de otros compuestos semejantes de mayor eficiencia como la betaína y el DTT (Ralser *et al.* 2006).

La utilización del DMSO en la reacción de PCR, se debe a su capacidad de afectar directamente el equilibrio iónico y la solvatación de ciertos agentes donadores de hidrogeno como el 2-ME. También altera la estructura del agua, formando hexámeros con las moléculas: una organización muy semejante al estado sólido; creando así un complejo altamente estructurado. Indirectamente, este nivel de organización, causa cambios a nivel celular en la conformación y asociación de las proteínas y otras moléculas, como el ADN. Una baja concentración de DMSO ayuda en la solución de problemas de especificidad, presencia de inhibidores y hasta problemas de formación de estructuras secundarias, como puede suceder en un iniciador tan largo como el TC2, de ahí que amplificara para las muestras de ADNs. (Szmant 2007, Vanden 2008).

Aunque cada coadyuvante posee su función específica dentro de la solución tampón, Ralser *et al.* 2006 comentan, que por separado, cada elemento inclusive podría presentar un papel inhibitorio en la PCR, por lo que se debe disponer de la solución tampón como un solo elemento. En el caso de la solución 11X, todos los elementos brindan propiedades muy semejantes al contenido celular, por lo que el trabajo de la polimerasa puede ser mas eficiente. Evidencia de esto es la

amplificación de las muestras de ADN<sub>s</sub> y algunas de ADN<sub>e</sub> después de los cambios realizados sobre la PCR.

Walker *et al* 1999, destacan la importancia de la utilización de métodos de extracción que asegure la obtención de un ADN de alta pureza como el método de fenol/cloroformo. En su investigación reportaron contaminación de las muestras y ausencia de ADN de alto peso molecular (23Kb), además de baja tasa de amplificación para muestras de epitelio bucal extraídas por un método que utiliza NaOH. Concluyen que la utilización de muestras frescas de epitelio bucal mejora en gran parte la tasa de éxito de amplificación y que su implementación en futuros estudios es de gran importancia para el cumplimiento de los objetivos de los mismos. Situación muy semejante a la ocurrida en este estudio, donde la utilización de saliva fresca resultó en un porcentaje de amplificación mayor, ya que evita la degradación del ADN.

Para los análisis de restricción, se utiliza generalmente un gel con una matriz de 1-2%, sin embargo, en este caso se utilizó una concentración de 4%. Esta es una diferencia importante pues los geles originales de 1-2% no permitían observar los productos de digestión por ser estos muy pequeños. Los geles al 4% sí permitieron la visualización de las bandas, producto del corte enzimático. (Van Pelt-Verkuil 2008).

Según Brophy *et al.* 2001, la variabilidad enzimática por concepto de los polimorfismos de PON1 corresponde a un 34% del total observado. De este porcentaje el polimorfismo T108C representa un 22%, L55M un 4% y Q192R un 6%. Estos datos se obtienen a partir de la actividad arilesterasa, relacionada directamente con la expresión de la enzima en suero. Todas las muestras amplificadas pudieron ser genotipadas. Sin embargo el polimorfismo más representativo no pudo ser determinado, por lo que se hace de gran importancia la normalización de la PCR para las muestras de la población diana.

Las frecuencias encontradas en este estudio se alejan bastante de otras investigaciones realizadas en distintas partes del mundo. Inclusive no cumple con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Los estudios confirman diferencias marcadas

dentro de las etnias, en cuanto a la presencia de uno u otro alelo para los distintos polimorfismos de PON1. La no concordancia con este estudio y el desequilibrio con la ley, puede deberse al tamaño de la muestra y a la diversidad étnica del País. (NCBI 2008).

## **CONCLUSIONES**

Se puede concluir que la utilización de la solución 11X, mejora en gran parte la obtención de amplicones en muestras de ADN, obtenidas a partir de células de epitelio bucal y extraídas por método de sales, para los polimorfismos Q192R y L55M. En el caso del polimorfismo T108C, en base a los resultados de amplificación, se puede afirmar que la utilización de la solución tampón 11X sumada la utilización de DMSO, es de gran utilidad en muestras de ADN proveniente de células de epitelio bucal, obtenidas a partir saliva, no así para las extraídas por cepillo.

Aunque fueron pocas las muestras que amplificaron, las enzimas utilizadas para la caracterización genética de PON1 en la población diana, pudieron ser probadas, obteniendo los polimorfismos QQ y LM como los más comunes en la población en estudio.

La PCR amplificó para las muestras de sangre y saliva fresca, logrando su normalización, con la posibilidad de utilizarse para estudios futuros; sin embargo, no se logró obtener el genotipo de la población diana, lo que no permitió realizar las comparaciones pertinentes entre grupos, resultando en un trabajo meramente descriptivo.

La utilización de muestras frescas aumenta en gran cantidad el porcentaje de amplificación, ya que la degradación genómica es mínima, así como contenido de agentes inhibidores.

## **RECOMENDACIONES**

Para mejorar la respuesta amplificadora se recomienda probar distintas concentraciones de los coadyuvantes utilizados y tratar con algunos otros de función semejante, como la utilización de betaina en lugar de DMSO, el DTT en lugar del 2-ME, la adición de KCl, Glicerol; detergentes como el Tween 20 o Nonidet P40, utilizados en el la solución de almacenaje de la Taq ADN polimerasa.

Se recomienda para futuros estudios relacionados, la utilización de sangre para la determinación del “PON1 Status”, el cual mide el nivel de actividad enzimática y concentración real en suero, lo cual no es posible determinar con la genotipificación por sí sola (Furlong *et al.* 2005). Sin embargo si el objetivo es la caracterización genética de una población, se insta a utilizar saliva fresca para la obtención de una mayor cantidad y calidad de ADN.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Al-Soud,W. y Rådström,P. "Effects of Amplification Facilitators on Diagnostic PCR in the Presence of Blood, Feces, and Meat". Clinical Microbiology.v.38 (12): 4463-4470,dec.,2000.
- Ames, Bruce. "An Enthusiasm for Metabolism". J. Biological Chemistry. v278(7): 4369-4380. Feb.2003.
- Bartlett, J. y Stirling, D. Pcr Protocols. 2 ed. New Jersey: Humana Press, 2003.(Methods in Molecular Biology, no.788).
- Berg,J.; Tymoczko,J. y Stryer,L.Biochemistry. 5 ed.S.l. WH Freeman & Co, 2002.
- Biggadike, K.; Angell, M.; Burgess, C.*et al.*. "Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism". Medicinal Chemistry. v43(1):19-21, Jan.2000.
- Blin, N. & Stafford, D. "A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes".Nucleic Acids Res. v3:2303-2308, 1976.
- Brophy, V.; Jampsa, R.; Clendenning, J. *et al.*. "Effects of 5` regulatory-region polymorphisms on paraoxonase- gene (PON1) expression". American Journal of Human Genetics. v68:1428–36. 2001.a
- Brophy, V.; Hastings, M.; Clendenning, J. *et al.*."Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter". Pharmacogenetics.v11:77–84.2001.b
- Campo, S.; Sardo, M.; Trimarchi., G. *et al.*."Association between serum paraoxonase (PON1) gene promoter T(-107)C polymorphism, PON1 activity and HDL levels in healthy Sicilian octogenarians". Experimental Gerontology. v39: 1089-1094. 2004.
- Clark, David. Molecular Biology. London: Elsevier Academia Press. 2005.

- Clendenning, J.; Humbert, R.; Green, E. *et al.*. “Structural organization of the human PON1 gene”. Genomics. v35: 586-589. 1996.
- Corvalán, Alejandro. “Parte I: Desarrollo y metodologías”. In Biología molecular en Infectología. Revista Chilena de Infectología. v19 (1): 14-24. 2002.
- Corzo, Francisco. Electroforesis [en línea]. La Laguna: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de la Laguna, 2006. “Geles de agarosa”. <<http://webpages.ull.es/users/fcorzo/electroforesis/indice.htm>> [Consulta: 25 nov. 2008].
- Costa, L.; Li, W.; Richter, R. *et al.*. “The role of Paraoxonase (PON1) in the detoxification of organophosphates and its human polymorphism”. Chemico biological Interactions. v119:429-438. 1999.
- Cozier, Y.; Palmer, J. y Rosemberg, L. “Comparison of methods for collection of DNA samples by mail in the Black Women`s Health Study”. Annals of epidemiology. v14 (2): 117-122. 2004.
- Dahmani, Y.; Diez, C.; Marcuello, A. *et al.* “Efectos de los polimorfismos de la paraoxonasa sobre la fertilidad masculina”. Madrid: Panel, Reunión Bases Moleculares de la Patología, XXVI Congreso, Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, 2003. <http://sebbm.bq.ub.es/sebbm/XXVICongreso/libabs/obtimpresbk.cgi?ref=P01023>. No publicado.
- Davies, H; Richter, R; Keifer, M. *et al.* “The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazinón, soman and sarín”. Nature Genetics. v14.334-336. 1996.
- Dávila, V.; Blemont, J.; Montero, R. *et al.* “De cómo el organismo metaboliza los contaminantes ambientales y los medicamentos: la importancia del citocromo P450” [En línea]. Gaceta Biomedicas. v4. Abril 2007. <[http://www.biomedicas.unam.mx/noticias\\_gaceta.htm](http://www.biomedicas.unam.mx/noticias_gaceta.htm)>. [Consulta: 8 En.2008].

- Erlich, P.; Lunetta, K.; Cupples, A. *et al.* "Polymorphisms in the PON gene cluster are associated with Alzheimer disease". Human Molecular Genetics.v15(1): 77-85. 2006.
- Ferré, N.; Camps, J. y Joven, J. (2004). "Paraoxonasa, acción antioxidante de las HDL y respuesta inflamatoria" Cardiovascular Risk Factors. v13(2):106-114,abr. 2004.
- Feigelson, H; Rodriguez, C; Robertson, A. *et al.* "Determinants of DNA yield and quality from buccal cell samples collected with mouthwash". Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. v10: 1005-1008. 2001.
- Feychting, M.; Plato, N.; Nice, G. *et al.* "Paternal occupational Exposures and Childhood Cancer". Environmental Health Perspective. v109(2). 193-196. 2001.
- Furlong, C.; Cole, T.; Jarvik, G. *et al.* "Role of Paraoxonase (PON1) Status in Pesticide Sensitivity: Genetic and Temporal Determinants".Neurotoxicology .v26. 652-659. 2005.
- García, M; Egan,K; Abruzzo,J; *et al.* "Collection of genomic DNA from adults in epidemiological studies by buccal cytobrush and mouthwash". Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. v10 (6):687-96. 2001
- Golmanesh, L.; Mehrani, H. and Tabei, M. "Simple Procedures for purification and stabilization of human serum paraoxonase-1". Biochemical and Biophysical Methods. v70(6):1037-42. Apr. 2007.
- Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., y Gelbart, W. M. Genetica. 7ed. (A. Laborda, Ed., & M. Elias, Trans.) Madrid: McGraw-Hill. 2002.
- Hall, T. "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98. 1999.

- Hansen, T.; Simonsen, M.; Nielsen, F.; y Andersen, Y. "Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: Comparison of the response rate and quality of genomic DNA". Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. v16(10):2072-76. 2007.
- Henegariu, O.; Heerema, N.; Dlouhy, S.; Vance, H.; y Vogt, P. "Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol". BioTechniques. v23:504-511. 1997.
- Hines, R.; Shehin, S.; Lee, M; *et al.* "Tissue- and developmental-specific expression of flavin-containing monooxygenase in the rabbit". The Toxicologist. v13(6).1993.
- Hodgson, E. y Levi, P. "Pesticides: an important but Underused Model for the Environmental Health Sciences". Environmental Health Perspectives. 104(1):97-106. Mar.1996.
- Jimenez, Celia. *Prácticas de Bioquímica y Biología Molecular*. Murcia: Unidad de Medicina. Universidad de Murcia, 2007. "Práctica 7. Análisis Electroforético de ácidos nucleicos en geles de agarosa". < <http://www.um.es/bbmbi/Docencia/Practicas/Medicina/PracticasLaboratorio/Practica07.htm> > [Consulta: 10 noviembre 2008].
- Keam, S. and Perry, C. "Prulifloxacin". Drugs. v64(19): 2221-2234(14). 2004.
- Khosravinia, H. and Ramesha, K. "Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction". African Journal of Biotechnology. v6 (3):184-187. 2007.
- La Du, B.; Aviram, M.; Billecke, S. *et al.* "On the physiological role of paraoxonases". Chemico Biological Interactions. v119:379-388. 1999.
- Li, W.; Costa, L.; Richter, R. *et al.* "Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates". Pharmacogenetics. v10: 767-780. 2000.

- Lowengart R.; Peters J.; Cicioni C. *et al.*. "Childhood leukemia and parents' occupational and home exposures". J Ntl Cancer Inst. v79:39-46. 1987.
- Kondoa, I; Yamamoto, M. "Genetic polymorphism of paraoxonasa 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson`s disease". *Brain Research.* v806 (2):271-273. 1998.
- Marrs, Timothy. "Organophosphates: history, chemistry, pharmacology". In Organophosphates and health. London: Imperial College Press. 2003.
- Mathews, C.; Van Holde, K. y Ahern, K. Bioquímica 3ed. Prentice Hall. Pag 434,847. 2002.
- Menegaux, F.; Baruchel, A.; Bertrand, Y. *et al.*. "House Exposure to pesticides and risk of childhood acute Leukemia". Occupational and Environmental Medicine. v63. 131-134. 2006.
- Monge, P; Wesseling, C; Guardado, J. *et al.* "Parental occupational exposure to pesticides and the risk of childhood leukemia in Costa Rica".Scand J Work Environmental Health. v33(4): 293-303.2007.
- Monge, P.; Wesseling, C.; Rodríguez, A. *et al.* "Childhood Leukemia in Costa Rica 1986-1996". Pediatric and Perinatal Epidemiology. v8(3):210-218. 2002.
- Monge, Patricia. Occupational exposure to pesticides and risk of leukemia among offspring in Costa Rica. Tesis. Stokcholm: Karolinska University. 2006.
- Monreal, J.; Marti, J. and Gispert, C. *Leucemia.* In Diccionario Enciclopédico Éxito. España. 2000.
- Morales, Ricardo. "Sustancias químicas cancerígenas en el sector industrial de Costa Rica: el uso de registros como herramienta de salud pública". Rev. costarric. salud pública v6(11):.11-19.dic.1997.

Morales, Fernando. <fernando.moralesmontero@ucr.ac.cr> “Protocolo de Extracción” [en línea].7 Nov.2008. Protocolo de extracción de ADN para células de epitelio bucal.

Müller, Sabine.ed. Nucleic Acids from A to Z. Wienheim : Wiley-VCH.2008.

Nanni O.; Amadori D.; Lugaresi C. *et al.* “Chronic lymphocytic leukaemias and non-Hodgkin’s lymphomas by histological type in farming-animal breeding workers: a population case-control study based on a priori exposure matrices”. Occup Environ Med .v53:652–657. 1996.

*NEB* [en línea]: New Englands Biolabs. [Suffolk]: “Enzyme Finder”.  
<http://www.neb.com/nebecomm/EnzymeFinderSearchByNameIntl.asp>.  
[Enero 2008].

Oviedo, Mauricio. Polimorfismos Genéticos Relacionados con la Desintoxicación por Exposición a Plaguicidas como posible agente causal de Leucemias infantiles. Tesis. San Pedro de Montes de Oca: Universidad de Costa Rica.2006.

Oviedo,C. and Rodriguez, J.”EDTA: The Chelating Agent under Environmental Scrutiny”. Quim. Nova. v26 (6):901-905. 2003.

Pasdar, A.; Ross, H.; Cumming, A. *et al.*.”Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population”. BMC Medical Genetics. v7:28. Mar.2005.

Petridou E. and Dessypris N.”Maternal pesticide exposure and childhood leukemia”. Epidemiol. v11:230. 2000.

Poet, T.; Wu, H.; Kousba, A. *et al.*. "In Vitro Rat Hepatic and Intestinal Metabolism of the Organophosphate Pesticides Chlorpyrifos and Diazinón".Toxicological Sciences. v7(2):193-200. Mar.2003.

Pond,A.; Chambers ,H. and Chambers, J.” Organophosphate detoxication potential of various rat tissues via A-sterases and aliesterase activities”. Toxicol Letters .v78(3):245–52. Aug.1995.

- Premoli, G.; Gonzáles, A.; Millán, B.; Percoco, T. y Vielma, A. “Diagnóstico de *Helicobacter pylori* mediante la reacción en cadena de la polimerasa.” Rev. Cubana Med Trop. v56 (2):85-90, Mayo-ago.,2004.
- Ruchu, D., Chabrière, E., and Masson, P. “Human Paraoxonase: A promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning”. Toxicology. v233:1-3. 2006
- Rybicki, Edward. <[ed.rybicki@uct.ac.za](mailto:ed.rybicki@uct.ac.za)>. “Question” [en línea].16 dic.2008. Coadyuvantes para PCR.
- Rybicki, Edward. “PCR Primer Design and Reaction Optimisation” [En línea]. En: Coyne,V.; James,D; Reid,S. *et al.*. (Ed).*Molecular Biology Techniques Manual.* 3 Ed. Cape Town: 2001. <http://www.mcb.uct.ac.za/pcroptim.htm#Annealing>. [Consulta: 8 En. 2008].
- Rylander,T.; Hakansson,N.; Tybring,G.; and Wolk,A. “Quality and quantity of saliva DNA obtained from self administrated oragene method-a pilot study on the cohort of Swedish men”. Cancer Epidemiology, Biomarkers Preview. v15:1742-5. 2006.
- Sanghera, D.; Saha, N.; Aston C. *et al.*”Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease”. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. v17: 1067-1073. 1997.
- Sirivasarai, J.; Kaojarern, S.; Yoovathaworn, K. *et al.*.”Paraoxonase (PON1) polymorphism and activity as the determinants of sensitivity to organophosphates in human subjects”. Chemico biological Interactions. v168. 184-192. 2007.
- Soto, Gabriela.Caracterización de las leucemias agudas en la población infantil costarricense. Tesis. San Pedro de Montes de Oca: Universidad de Costa Rica.2002.
- Sudbery, Peter. Genetica Molecular Humana. (M. Martin, Ed.) Madrid: Pearson Education.2004.

- Szmant, H. *Physical properties of Dimethyl Sulfoxide and its Function in Biological Systems* [en línea]. Michigan: Department of Chemistry, University of Detroit, 2007. <<http://www.dmsso.org>> [Consulta: 10 noviembre 2008].
- Vanden, Jack. <jpv2@psu.edu> “Question” [en línea]. 16 dic. 2008. Coadyuvantes para PCR.
- Van Pelt-Verkuil, E.; van Belkum, A. and Hays, P. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification. Springer Science, 2008.
- Vector NTI* [en disco]. Ver 10. Invitrogen Corp Software. 2006.
- Vineis, P.; Malats, N.; Lang, M. *et al.*. Metabolism Polymorphism and susceptibility to Cancer. Lyon: IARC Scientific Publication. No 148. 1999.
- Walker, A; Najarian, D; White, D. *et al.* “Collection of Genomic DNA by Buccal Swabs for Polymerase Chain Reaction-Based Biomarker Assays”. Environ Health Perspect. v107(7): 517-520. 1999.
- Wesseling, I. y de la Cruz. *Experiencias de la lucha en contra del uso indiscriminado de plaguicidas: El caso de Costa Rica / América Central* [En línea]. Heredia: Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (IRET), Universidad Nacional. Set. 2006. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/luta\\_agrotoxicos\\_costa\\_rica.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/luta_agrotoxicos_costa_rica.pdf) . [Consulta: 1 Enero 2008].

# **ANEXOS**

## **Anexo 1. Método de extracción salina para las muestras.**

Primeramente se toma muestra de epitelio bucal de los individuos por medio de cepillos y se colocan en un tubo de 15ml. Se agrega 1ml de la solución SSC 1X (Solución SSC 20X: 3M NaCl, 0.3M Citrato de Sodio) y se deja en el rotor por 24h. Se centrifuga a 3000 rpm por 10 min. Se toman 500µl y se colocan en un tubo de 1.5ml, se agrega 1ml de solución SSC 1X y se centrifuga a 3000rpm por 10min. Se sustituye el sobrenadante por 100 µl de solución SSC 1X y se resuspende el botón. Se agrega 400 µl de la solución de lisis mas 6 µl de proteinasa K; se agita en el vortex y se mantiene a 60°C por 24h. Posteriormente se añaden 200 µl de solución de NaCl 5M y se agita vigorosamente con el vortex. Se centrifuga a 3000rpm por 10min. Se trasvasa 650 µl del sobrenadante a un tubo de 1.5ml, se agrega un volumen de isopropanol y se mantiene por 2h a -70°C. Se centrifuga a 13000rpm por 5min, se elimina el sobrenadante y se lava el botón con 1ml de etanol 80%. Seguidamente se centrifuga nuevamente a 13000rpm por 10min, se elimina el sobrenadante y se mantienen los tubos en cámara de flujo laminar el tiempo necesario para la eliminación completa del etanol restante. Se agrega 100 µl de agua nanopura y se mantiene a 4°C hasta su uso.