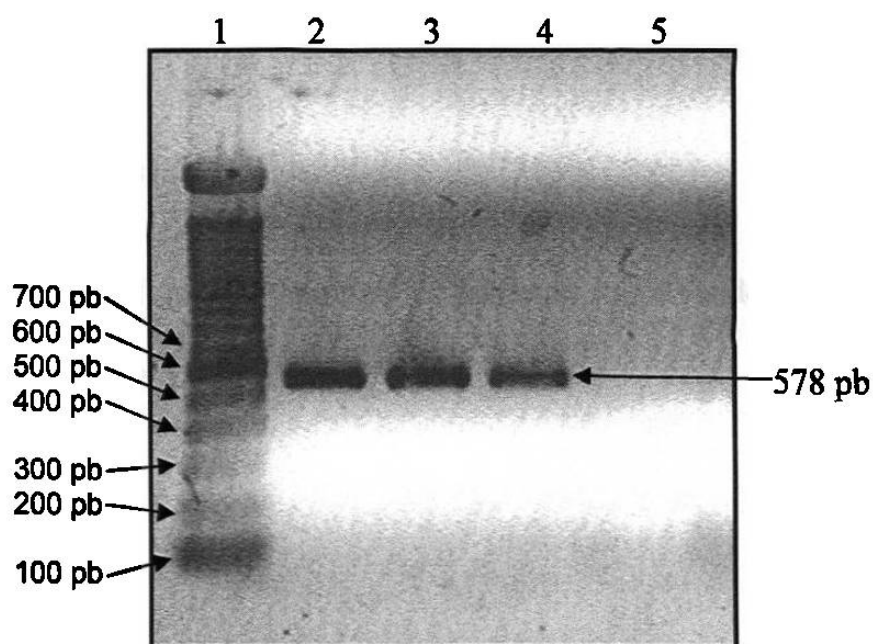


**Figura 7.** Producto amplificado de 866 pb. Gel de agarosa al 1% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular  $\lambda + Pst$  I; de los carriles 2-7: Producto amplificado de 866pb y en el carril 8: Control negativo.

#### 4.2.2 Amplificación del fragmento de 578pb.

El producto amplificado de 578 pb se muestra en la figura 8, el cual se utilizó para la genotipificación.



**Figura 8.** Producto amplificado de 578 pb. Gel de agarosa al 1.5 % que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-4: Producto amplificado de 578pb y en el carril 5: Control negativo.

### 4.2.3 Amplificación del fragmento de 141pb.

El producto amplificado de 141 pb se muestra en el gel de la figura 9, mismo en el que se analizó la presencia del polimorfismo T341C.

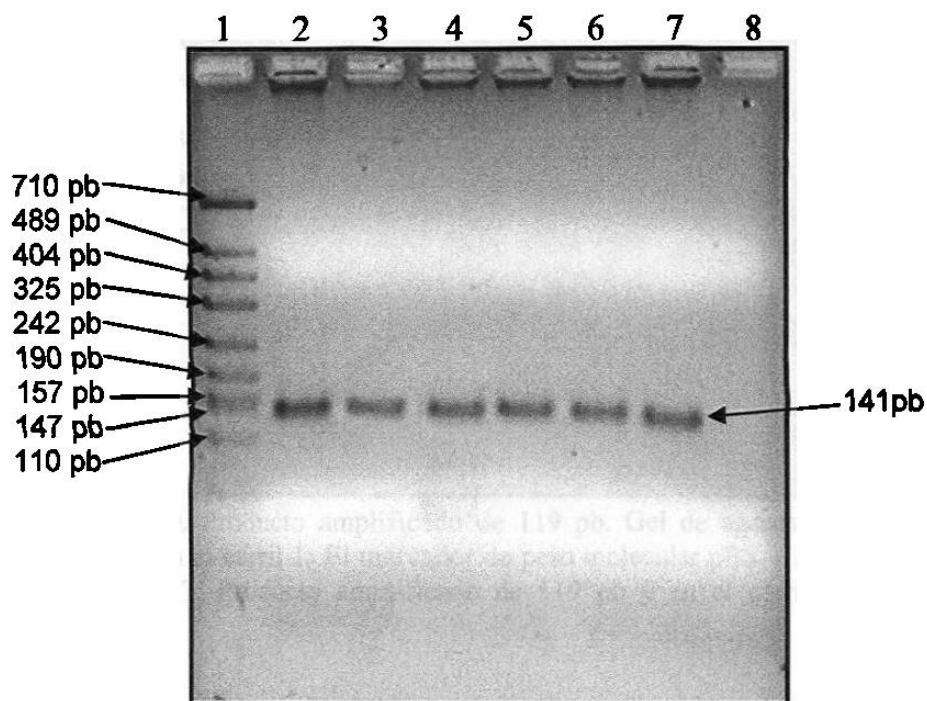


Figura 9. Producto amplificado de 141 pb. Gel de agarosa al 2% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular pBS + *Msp* I; de los carriles 2-7: Producto amplificado de 141 pb y en el carril 8: Control negativo.

### 4.2.4 Amplificación del fragmento de 119pb.

El gel de la figura 10 muestra el producto amplificado de 119 pb donde se analizó la presencia del polimorfismo A803G.

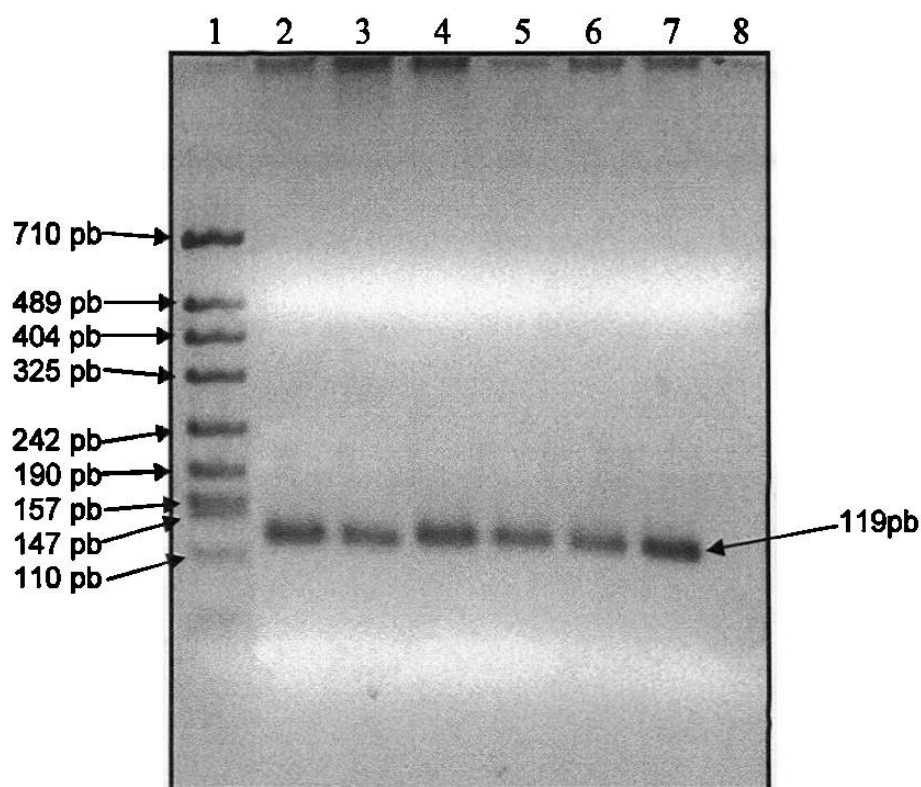


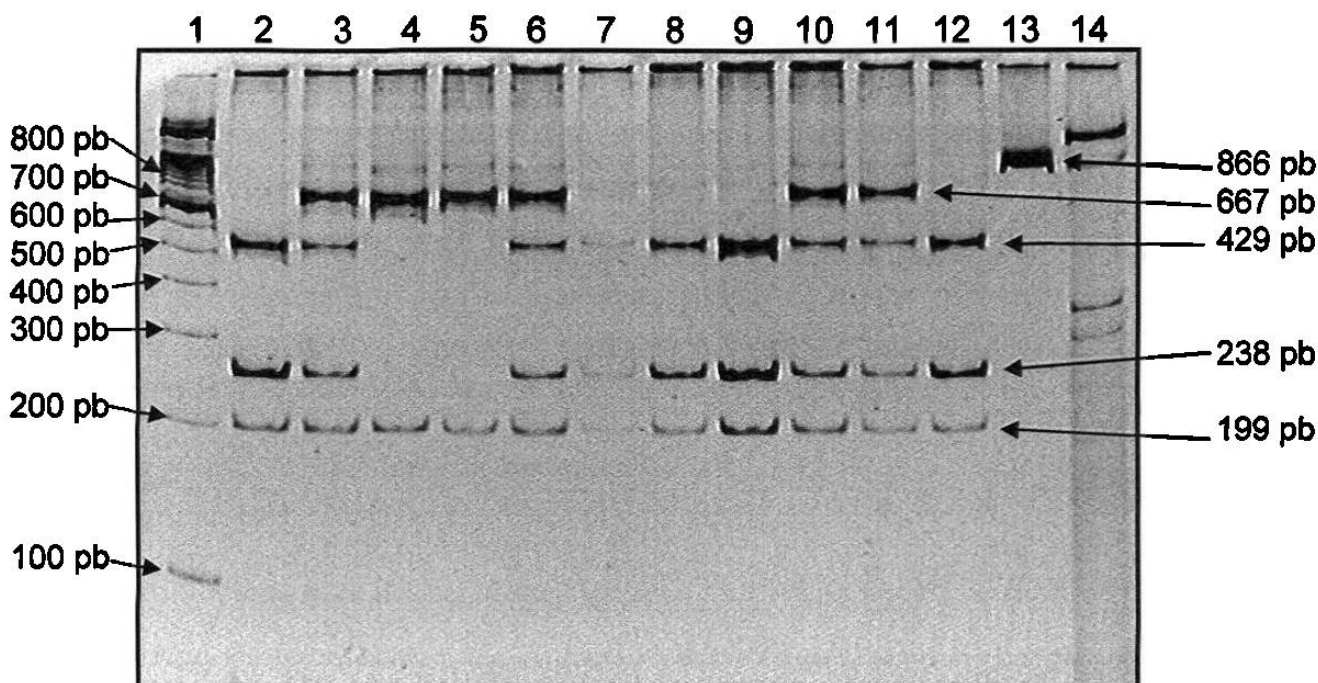
Figura 10. Producto amplificado de 119 pb. Gel de agarosa al 2% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular pBS + *Msp* I; de los carriles 2-7: Producto amplificado de 119 pb y en el carril 8: Control negativo.

### 4.3 Identificación de polimorfismos por RFLPs.

#### 4.3.1 Identificación de los polimorfismos en el producto amplificado de 866 pb

En el gel de la figura 11 se muestra una doble digestión del producto amplificado de 866pb con la enzima *Fok* I para detectar el polimorfismo C282T y la enzima *Dra* III para identificar el polimorfismo A845C. Los fragmentos que se esperaban para un sujeto homocigoto normal son los de 429 pb, 238 pb, 199 pb. En un sujeto heterocigoto para el polimorfismo C282T se esperaban los fragmentos antes mencionados y además un fragmento adicional de 667 pb. En el sujeto homocigoto para el polimorfismo C282T se esperaban el fragmento de 199 pb y el de 667 pb, el cual se forma por la pérdida del sitio

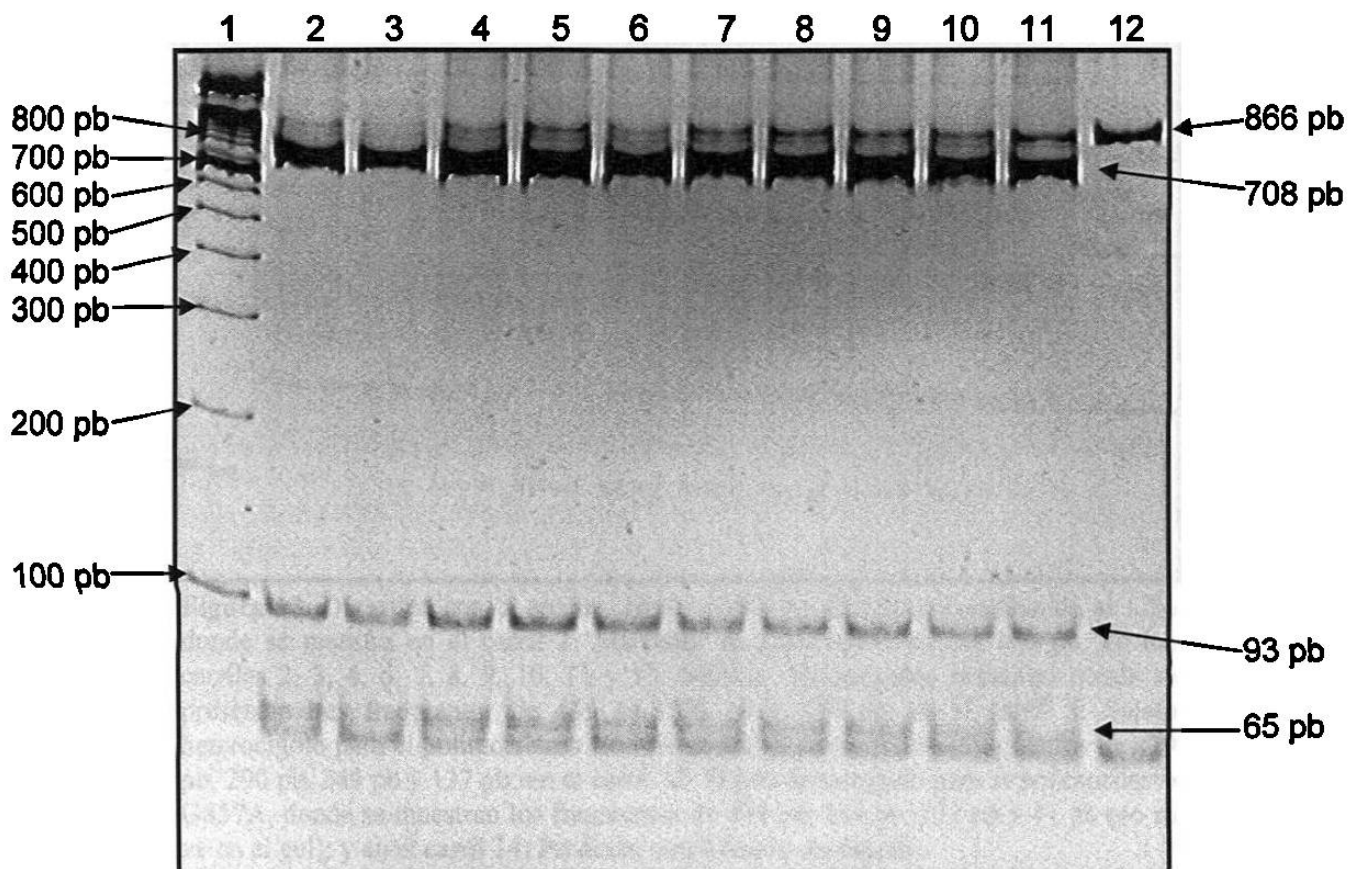
de corte para la enzima *Fok* I al no generarse los fragmentos de 429 pb y 238 pb. En un sujeto heterocigoto para el polimorfismo A845C se esperaban los fragmentos mencionados para el homocigoto normal (429 pb, 238 pb, 199 pb) y dos fragmentos más de 814 pb y 52 pb. En el sujeto homocigoto para este polimorfismo (A845C) se crea un sitio de corte para enzima *Dra* III generando dos fragmentos de 814 pb y 52 pb.



**Figura 11.** Digestión con las enzimas *Fok* I (C282T) y *Dra* III (A845C). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2, 7, 8, 9 y 12: Sujetos homocigotos normales donde se presentan tres fragmentos de 429 pb, 238 pb y 199 pb; en los carriles 3, 6, 10 y 11: Sujetos heterocigotos para la mutación C282T donde se muestran los fragmentos de 667 pb, 429 pb, 238 pb y 199 pb; en los carriles 4 y 5, Sujetos homocigotos para el polimorfismo C282T, donde se muestran los fragmentos de 667 pb y 199 pb; en el carril 13: Producto amplificado sin digerir; y en el carril 14: pBS digerido con *Fok* I y *Dra* III como testigo de corte. El polimorfismo A845C no se detectó, al no encontrarse las bandas esperadas de 814 pb y 52 pb.

En la figura 12 podemos ver el gel con la digestión del producto amplificado de 866 pb digerido con la enzima *Msp* I para los polimorfismos G191A y A434C, en el cual solo se observan homocigotos normales para ambos polimorfismos. Los fragmentos de 708 pb, 93 pb y 65 pb son los esperados para los homocigotos normales para estos dos

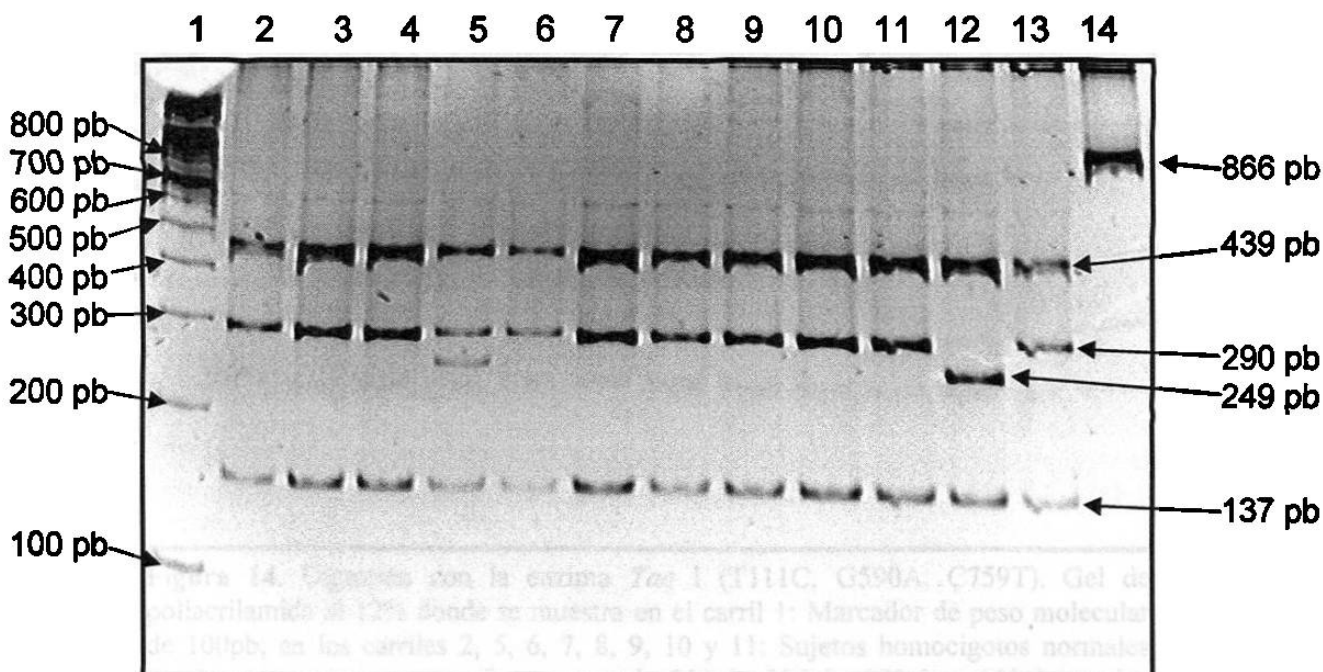
polimorfismos. En el polimorfismo G191A se esperaban los fragmentos de 801 pb y 65 pb, en donde el fragmento de 801 pb se generaba al perderse el sitio de corte de la enzima, uniéndose los fragmentos de 708 pb y 93 pb. Para el polimorfismo A434C se esperaba que se creara un sitio de corte para la enzima, en el fragmento de 708 pb del cual se iban a formar dos fragmentos de 464 pb y 244 pb, y por lo tanto se esperaban los fragmentos de 464 pb, 244 pb, 93 pb y 65 pb.



**Figura 12.** Digestión con la enzima *Msp* I (G191A, A434C). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2-11: Sujetos homocigotos normales donde se presentan tres fragmentos de 708 pb, 93 pb y 65 pb; y en el carril 12: Producto amplificado sin digerir.

La figura 13 muestra la digestión del producto amplificado de 866 pb con la enzima *Hinf* I para detectar el polimorfismo G857A. Los sujetos homocigotos normales presentan tres fragmentos de 439 pb, 290 pb y 137 pb. Los sujetos heterocigotos para el

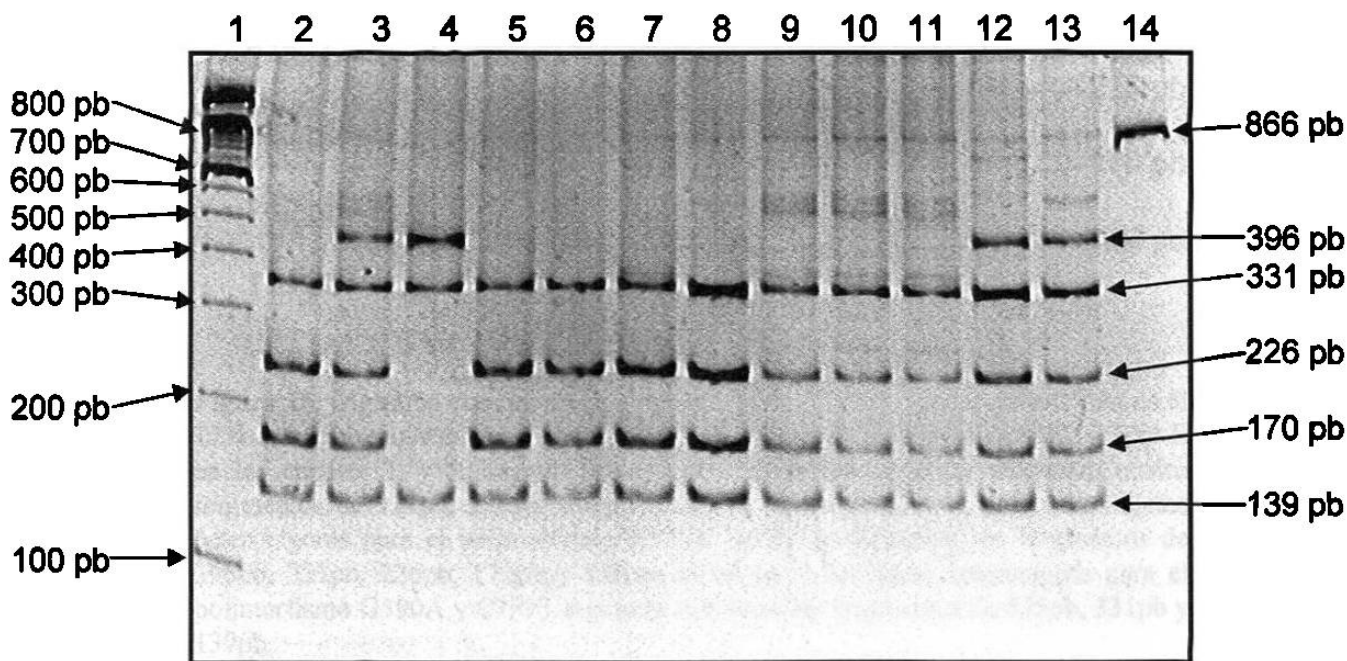
polimorfismo G857A presentan los tres fragmentos igual que el sujeto normal más otro fragmento de 249 pb. Los sujetos homocigotos para este polimorfismo presentan los fragmentos de 439 pb, 137 pb y el fragmento de 249 pb. El fragmento de 249 pb se forma al crearse un sitio de corte para la enzima *Hinf* I, el cual corta el fragmento de 290 pb en dos fragmentos uno de 249 pb y otro de 41 pb que no se alcanza a ver en el gel.



**Figura 13.** Digestión con la enzima *Hinf* I (G857A). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13: Sujetos homocigotos normales donde se presentan tres fragmentos de 439 pb, 290 pb y 137 pb; en el carril 5: Sujeto heterocigoto para el polimorfismo G857A donde se presentan los fragmentos de 439 pb, 290 pb, 249 pb y 137 pb; en el carril 12: Sujeto homocigoto para el polimorfismo G857A, donde se muestran los fragmentos de 439 pb, 249 pb, 137 pb y 41 pb (no se ve en el gel); y en el carril 14: Producto amplificado sin digerir.

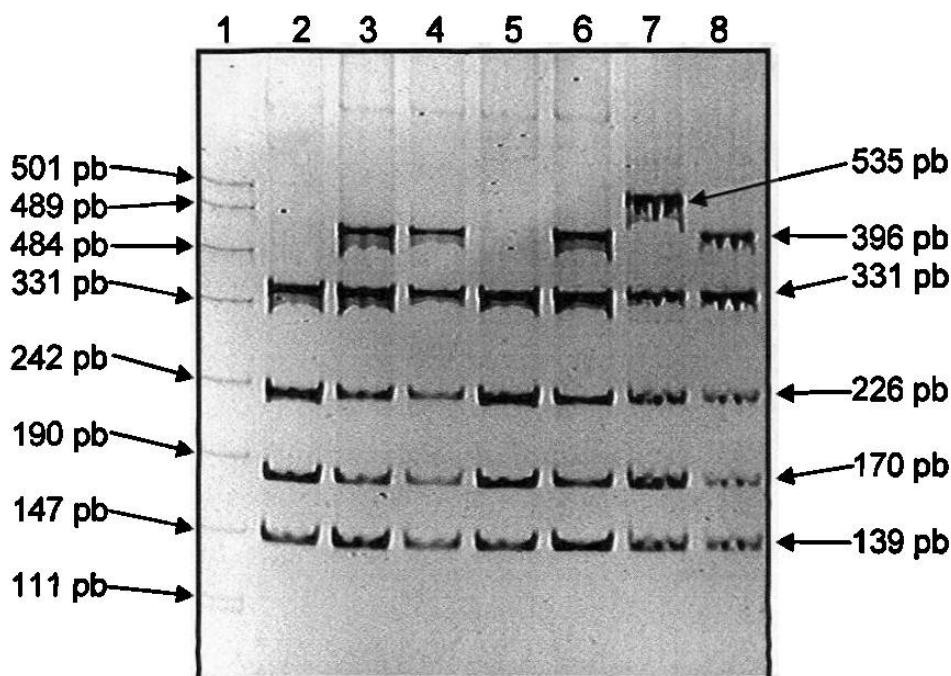
El gel de la figura 14 muestra la digestión del producto amplificado de 866 pb con la enzima *Taq* I para los polimorfismos T111C, G590A y C759T. Los sujetos homocigotos normales presentan cuatro fragmentos de 331 pb, 226 pb, 170 pb y 139 pb. Los sujetos heterocigotos para el polimorfismo G590A, además de presentar los cuatro fragmentos anteriores presentan otro de 396 pb. En los sujetos homocigotos para el

polimorfismo G590A los fragmentos de 396 pb, 331 pb y 139 pb están presentes. El fragmento de 396 pb se forma por la pérdida de un sitio de restricción para la enzima *Taq* I, uniéndose los fragmentos de 226 pb y 170 pb.



**Figura 14.** Digestión con la enzima *Taq* I (T111C, G590A, C759T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb; en los carriles 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11: Sujetos homocigotos normales donde se presentan cuatro fragmentos de 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en los carriles 3, 12 y 13: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo (G590A) donde se presentan los fragmentos de 396pb, 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en el carril 4: Sujeto homocigoto para el polimorfismo G590A donde se muestran los fragmentos de 396pb, 331pb y 139pb; y en el carril 14: Producto amplificado sin digerir.

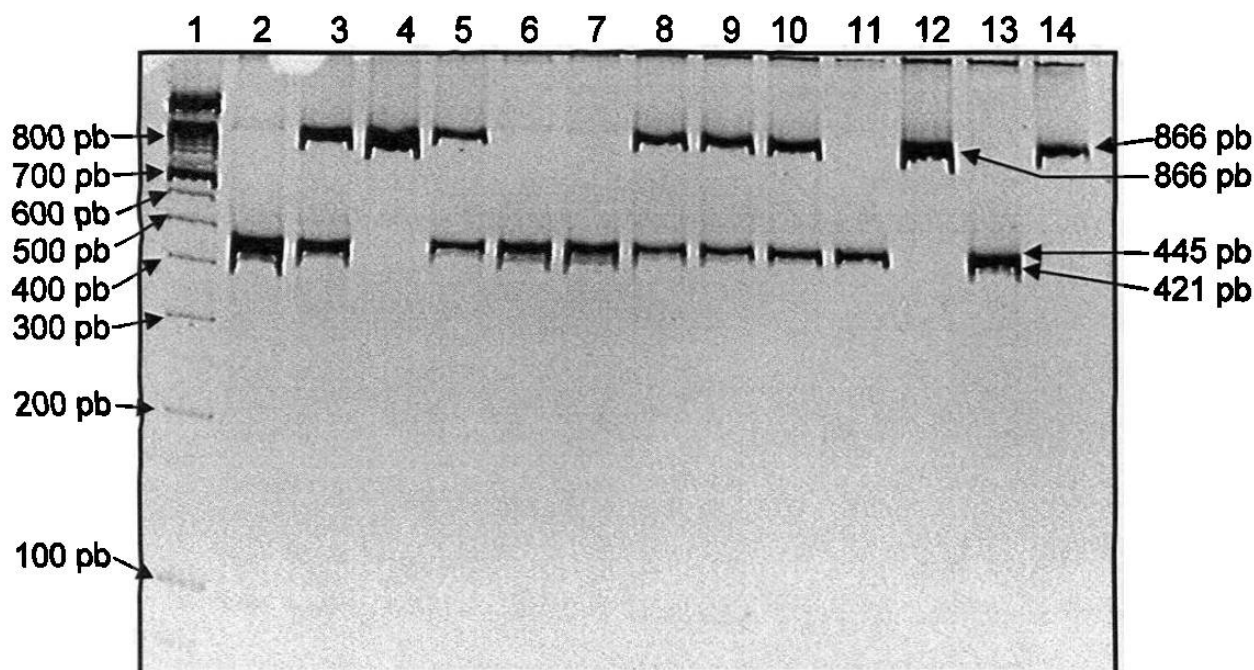
Cuando los polimorfismos G590A y C759T se presentan en el mismo alelo (Figura 15), ambos eliminan sus respectivos sitios de corte para la enzima y por lo tanto los fragmentos 226 pb, 170 pb y 139 bp se unen formando un fragmento de 535 pb.



**Figura 15.** Digestión con la enzima *Taq* I (G590A, C759T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de pUC + *Msp* I; en los carriles 2, y 5: Sujetos homocigotos normales donde se presentan cuatro fragmentos de 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en los carriles 3, 4, 6 y 8: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo G590A donde se presentan los fragmentos de 396pb, 331pb, 226pb, 170pb y 139pb; en el carril 7: Sujeto heterocigoto para el polimorfismo G590A y C759T donde se muestran los fragmentos de 535pb, 331pb y 139pb.

El gel de la figura 16 muestra la digestión del producto amplificado de 866 pb con la enzima *Kpn* I para el polimorfismo C481T. Para los sujetos homocigotos normales para el polimorfismo C481T se esperaban dos fragmentos de 445 pb y 421 pb respectivamente, los cuales no se alcanzan a separar en el gel. Los sujetos heterocigotos para este polimorfismo presentan tres fragmentos de 866 pb, 445 pb y 421 pb. Los sujetos homocigotos con el polimorfismo C481T pierden el sitio de corte para la enzima *Kpn* I, por lo tanto esta enzima no corta el producto amplificado y se esperaba un fragmento de 866 pb.

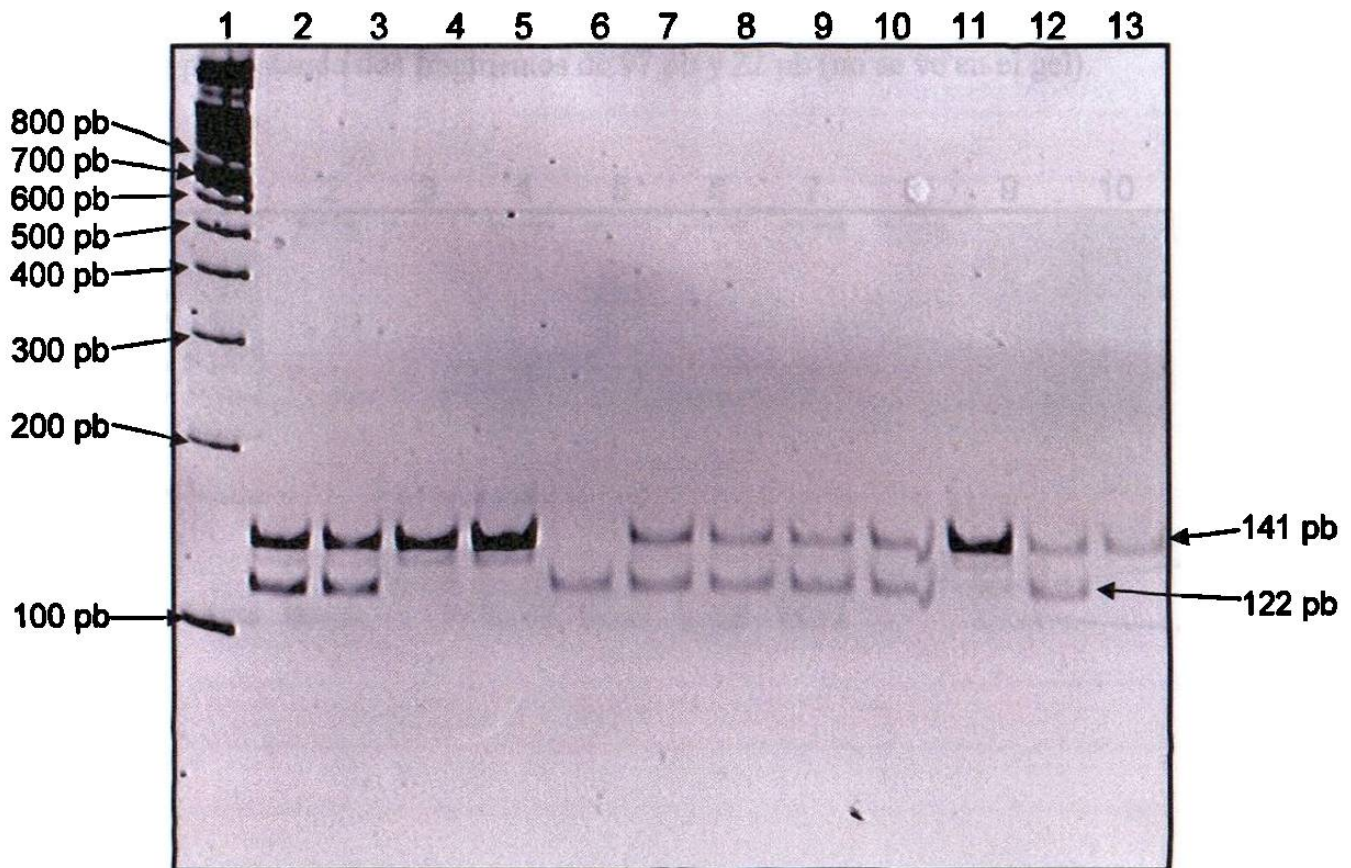




**Figura 16.** Digestión con la enzima *Kpn* I (C481T). Gel de poliacrilamida al 12% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 2, 6, 7, 11 y 13: Sujetos homocigotos normales donde se presentan los dos fragmentos de 445 pb y 421 pb (no se alcanzan a separar); en los carriles 3, 5, 8, 9 y 10: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo donde se presentan los fragmentos de 866 pb, 445 pb y 421 pb; en los carriles 4 y 12: Sujetos homocigotos para el polimorfismo C481T, donde se muestra el fragmento de 866 pb; y en el carril 14: Producto amplificado sin digerir.

#### 4.3.2 Identificación del polimorfismo T341C en el producto amplificado de 141 pb

En la figura 17 se muestra un gel con la digestión del producto amplificado de 141 pb con la enzima *Msp* A1 I para el polimorfismo T341C. Los sujetos homocigotos normales para este polimorfismo no tienen sitio de corte para la enzima, por lo tanto el fragmento esperado es igual al del producto amplificado de 141 pb. Los heterocigotos presentan tres fragmentos de 141pb, 122pb y 19pb. Los sujetos homocigotos para el polimorfismo T341C, se les crea un sitio de corte para la enzima presentando dos fragmentos de 122pb y 19pb (no se ve en el gel) y desaparece el de 141pb.

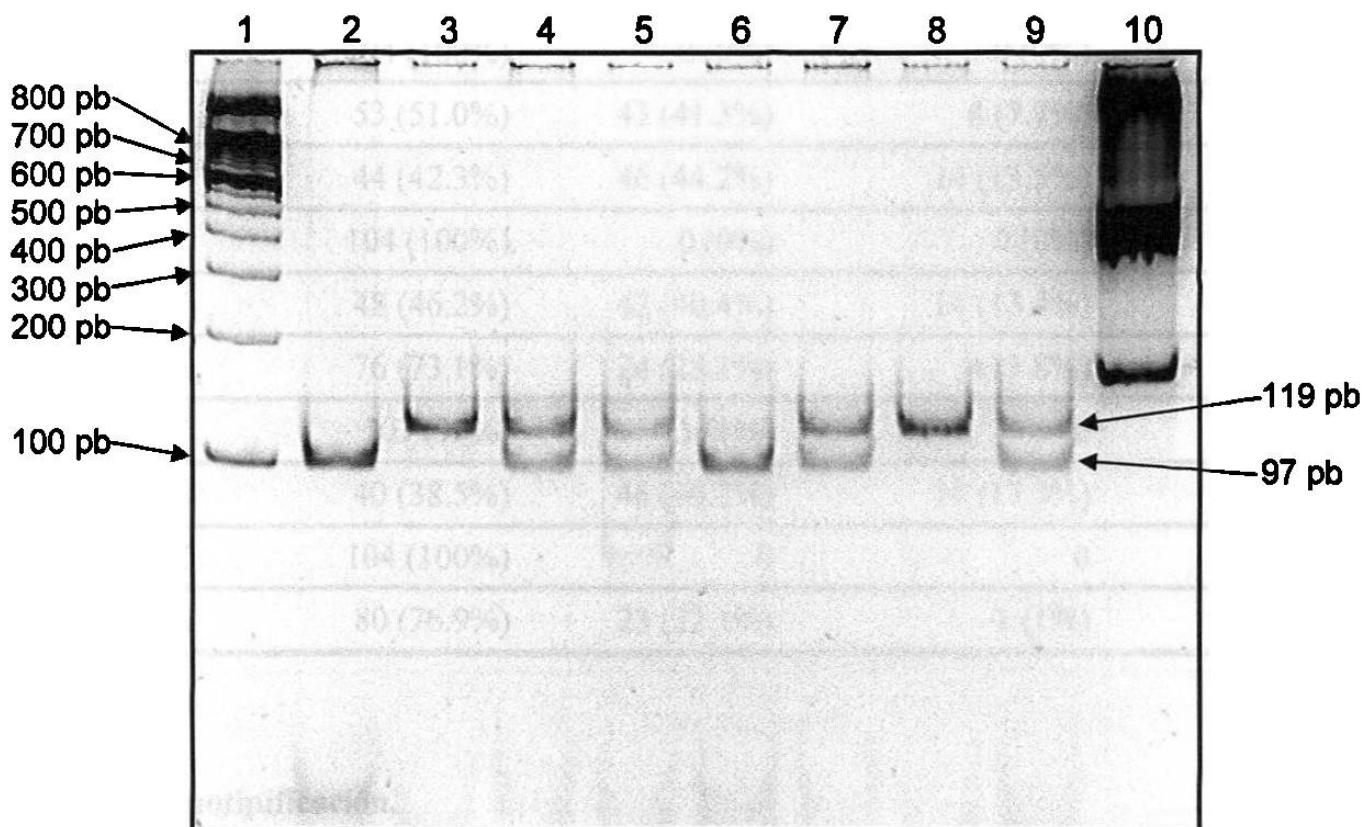


**Figura 17.** Digestión con la enzima *Msp* A1 I (T341C). Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 4, 5 y 11: Sujetos homocigotos normales donde se presenta el fragmento de 141 pb; en los carriles 2, 3, 7, 8, 9, 10 y 12: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo donde se presentan los fragmentos de 141 pb, 122 pb y 19 pb; en el carril 6: Sujeto homocigoto para el polimorfismo T341C, donde se muestran los fragmentos de 122 pb y 19 pb (no se ve en el gel); y en el carril 13: Producto amplificado sin digerir.

#### 4.3.3 Identificación del polimorfismo A803G en el producto amplificado de 119 pb

El gel de la figura 18 muestra la digestión del producto amplificado de 119 pb con la enzima *Dde* I para el polimorfismo A803G. En los sujetos homocigotos normales para polimorfismo A803G no tiene sitio de corte para la enzima *Dde* I, por lo tanto el fragmento esperado es igual al del producto amplificado de 119 pb. Los heterocigotos presentan tres fragmentos de 119 pb, 97 pb y 22 pb. Los sujetos homocigotos para el

polimorfismo A803G, se les origina un sitio de corte debido a este polimorfismo para la enzima presentando dos fragmentos de 97 pb y 22 pb (no se ve en el gel).



**Figura 18.** Digestión con la enzima *Dde* I (A803G). Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; en los carriles 3, y 8: Sujetos homocigotos normales donde se presenta el fragmento de 119 pb; en los carriles 4, 5, 7 y 9: Sujetos heterocigotos para el polimorfismo A803G donde se presentan tres fragmentos de 119 pb, 97 pb y 22 pb; en los carriles 2 y 6: Sujetos homocigotos para el polimorfismo A803G donde se muestran los fragmentos de 97 pb y 22 pb (no se ve en el gel); y en el carril 10: pBS digerido con *Dde* I como patrón de corte.

#### 4.4 Análisis de la presencia de los polimorfismos en cada una de las muestras.

De los geles anteriores se obtuvieron las frecuencias de los polimorfismos en la población estudiada. Como se muestra en la tabla XXIII solamente 8 de los 11 polimorfismos estudiados se encontraron en esta población.

**Tabla XXIII.** Frecuencia de los polimorfismos en la población de estudio.

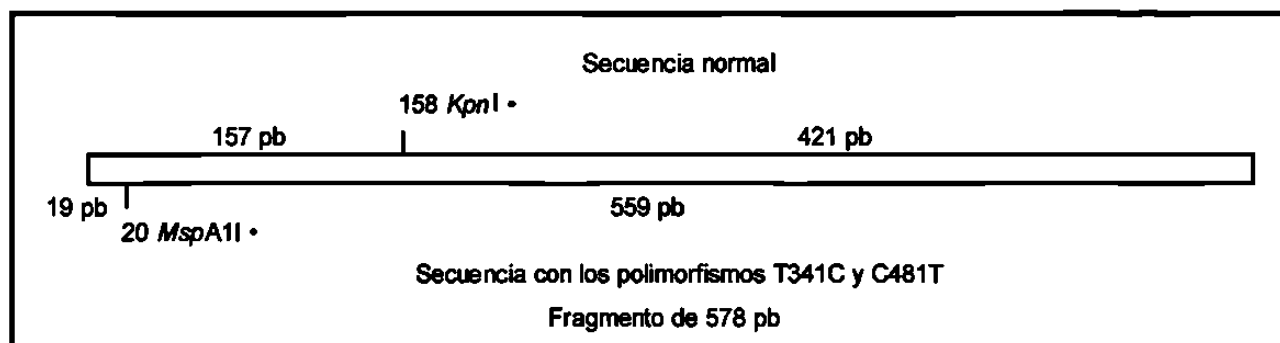
Polimorfismo	Homocigoto Normal (N/N)	Heterocigotos (N/P)	Homocigoto para el polimorfismo (P/P)
T111C	104 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
G191A	104 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
C282T	53 (51.0%)	43 (41.3%)	8 (7.7%)
T341C	44 (42.3%)	46 (44.2%)	14 (13.5%)
A434C	104 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
C481T	48 (46.2%)	42 (40.4%)	14 (13.4%)
G590A	76 (73.1%)	24 (23.1%)	4 (3.8%)
C759T	103 (99%)	1 (1%)	0
A803G	40 (38.5%)	46 (44.2%)	18 (17.3%)
A845C	104 (100%)	0	0
G857A	80 (76.9%)	23 (22.1%)	1 (1%)

#### 4.5 Genotipificación.

Al conocer los polimorfismos presentes en cada individuo, se les pudo asignar los alelos que les correspondían, utilizando la nomenclatura existente (tabla I). Como en esta nomenclatura a cada alelo le corresponde un polimorfismo o una combinación de polimorfismos, solamente los individuos que eran homocigotos, homocigotos más un solo polimorfismo heterocigoto y heterocigotos de un solo polimorfismo, se podían asignar los alelos. Para los individuos que no presentaban las características anteriores, lo cual fue muy frecuente como puede observar en la tabla XXIV, la asignación de alelos se realizó determinando cuales polimorfismos correspondían a cada alelo.

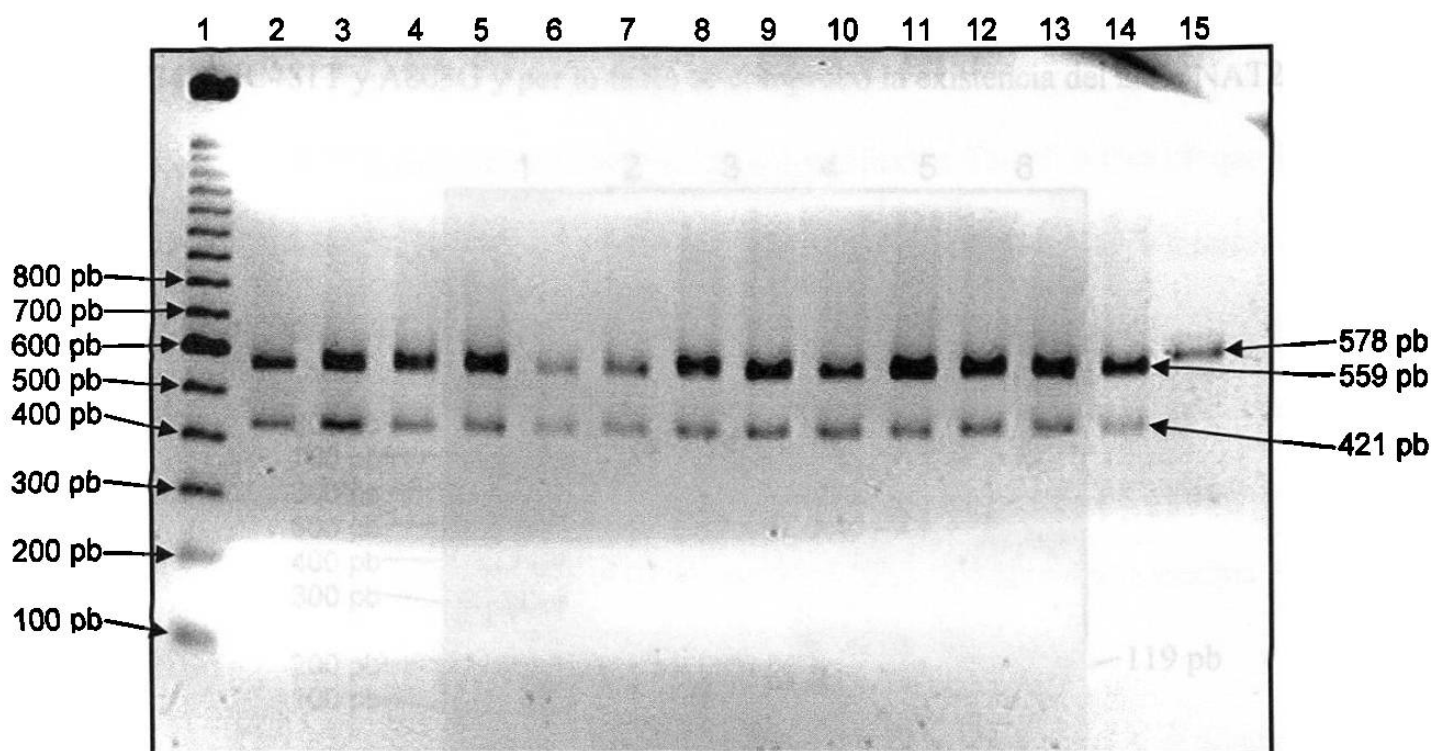
Cuando el alelo NAT2\*5B se encontraba junto con los alelos NAT2\*4, NAT2\*6A, NAT2\*6B, NAT2\*6C, NAT2\*7B, NAT12\*A, NAT2\*12B en una persona heterocigota, se procedió a identificar si los polimorfismos T341C, C481T y A803G que conforman el alelo NAT2\*5B se encontraban en el mismo alelo. Para comprobar que se encontraban juntos se digirió el fragmento de 578 pb (figura 8) con las enzimas *Kpn* I y *Msp* A1 I (figura 21), para determinar que los polimorfismos (T341C y C481T) estaban en el mismo alelo.

Como se observa en la figura 19 el alelo con la secuencia normal lo corta la enzima *Kpn* I en dos fragmentos de 421 pb y 157 pb (no se ve en el gel), debido a que no contenía el polimorfismo C481T.



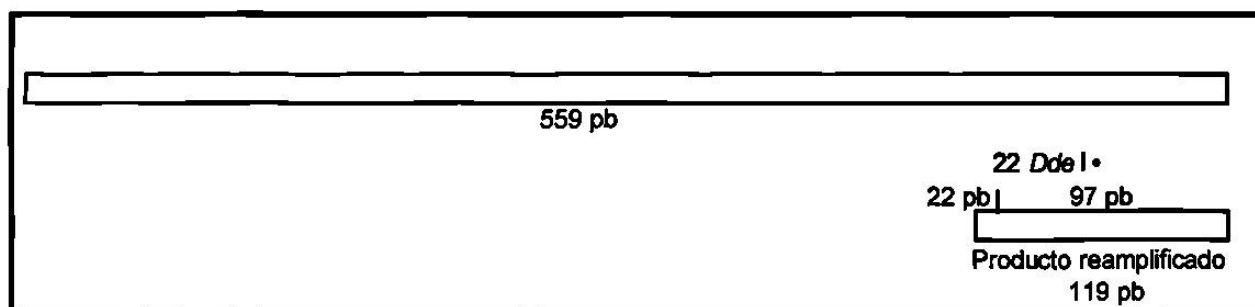
**Figura 19.** Fragmento de 578 pb digerido con las enzimas *Kpn* I (C481T) y *Msp* A1 I (T341C). En la secuencia normal (parte superior), se observa que al no tener el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I corta el fragmento de 578 pb, y al no encontrarse el polimorfismo T341C la enzima *Msp* A1 I no corta este fragmento. La secuencia con los polimorfismos C481T y T341C (parte inferior), se observa que al tener el polimorfismo C481T la enzima *Kpn* I no corta el fragmento de 578 pb, y al encontrarse el polimorfismo T341C la enzima *Msp* A1 I corta este fragmento.

El alelo NAT2\*5B al tener el polimorfismo (C481T) la enzima *Kpn* I no cortaría el fragmento, quedando de 578 pb, pero si el polimorfismo T341C se encontraba en el mismo alelo, la enzima *Msp* A1 I debería cortar el fragmento de 578 pb que no cortó la enzima *Kpn* I en dos fragmentos de 559 pb y 19 pb (figuras 19 y 20).



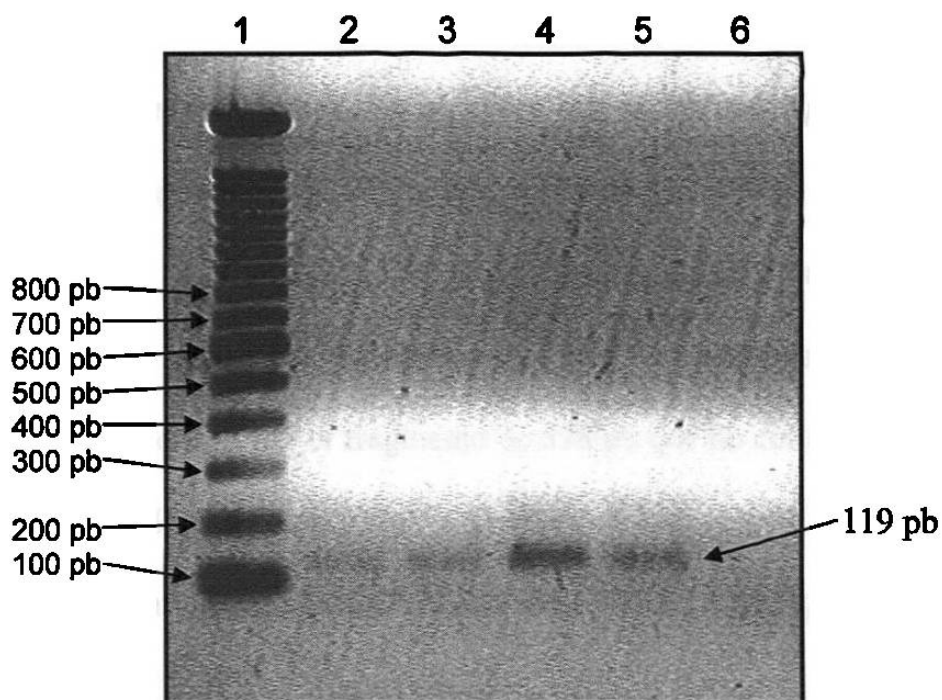
**Figura 20.** Digestión con las enzimas *Kpn* I (C481T) y *Msp* A1 I (T341C). Gel de agarosa al 1.5% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-14: Sujetos con ambos polimorfismos en el mismo alelo donde se presentan los fragmentos de 559 pb y 19 pb (no se ve en el gel), los fragmentos de 421 pb y 157 pb (no se ve en el gel) son parte del otro alelo; y en el carril 15: producto amplificado sin digerir.

Posteriormente se recuperó la banda de 559 pb del gel (figura 20) y se reamplificó el fragmento de 119 pb como se ve en la figura 22, en el cual se buscaba el polimorfismo A803G con la enzima *Dde* I (figura 23), donde se esperaban los fragmentos de 97 pb y 22 pb (figura 21).

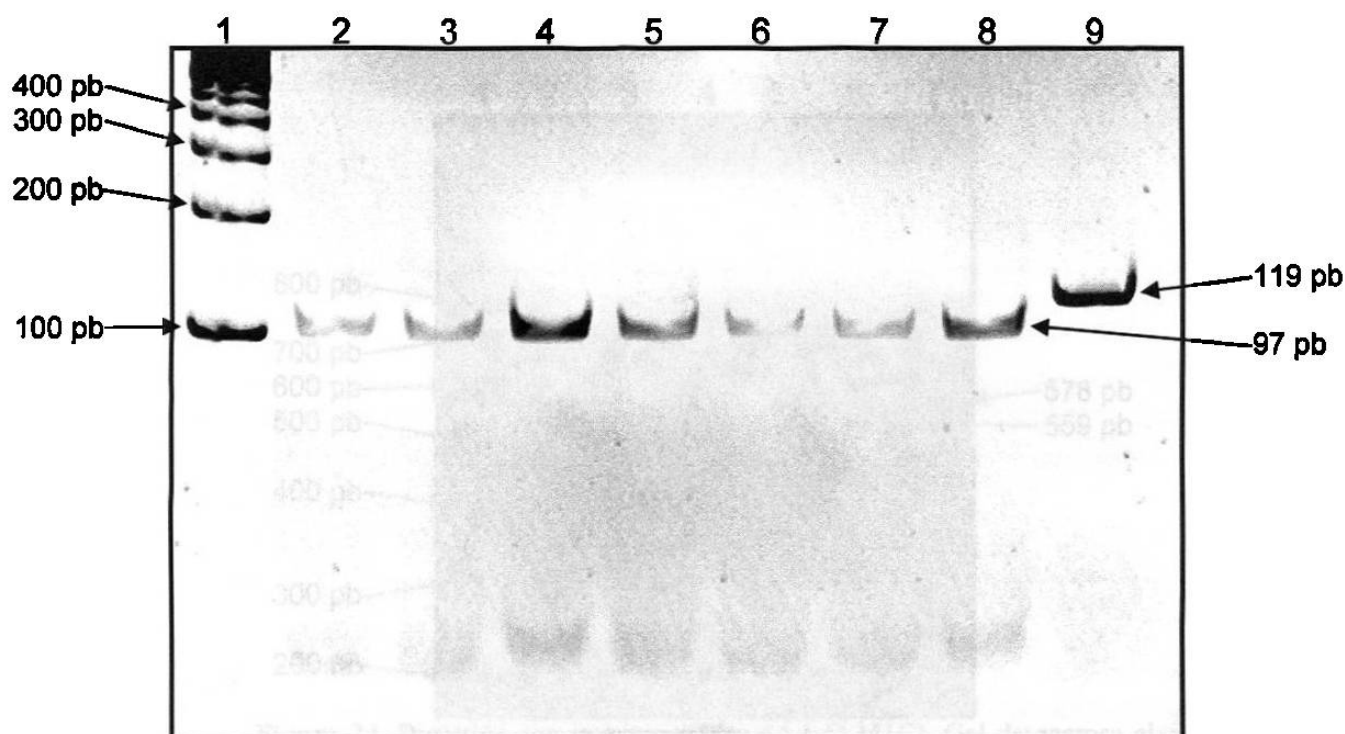


**Figura 21.** Secuencia recuperada del gel con el polimorfismo A803G, reamplificada y digerida con la enzima *Dde* I (A803G). En la figura se observa el fragmento reamplificado de 119 pb, que al tener el polimorfismo A803G la enzima *Dde* I lo corta en dos fragmentos de 22 pb y 97 pb.

De esta manera se demostró que en el mismo alelo estaban los polimorfismos T341C, C481T y A803G y por lo tanto se comprobó la existencia del alelo NAT2\*5B.



**Figura 22.** Producto reamplificado de 119 pb. Gel de agarosa al 2% que muestra en el carril 1: El marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 2-5: Producto reamplificado de 119 pb y en el carril 6: Control negativo.



**Figura 23.** Digestión con la enzima *Dde* I (A803G). Gel de poliacrilamida al 15% donde se muestra en el carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb; de los carriles 3-8: Sujetos que presentan el polimorfismo A803G donde se muestran los fragmentos de 97 pb y 22 pb (no se ve en el gel); y en el carril 9: Producto reamplificado sin digerir.