

## Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones

MARCO ANTONIO CHECA CARATACHEA\*

\* Estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Laboratorio de Biología Molecular. Unidad de Investigación, INER Ismael Cosío Villegas.  
Trabajo recibido: 22-VI-2007; aceptado: 15-VIII-2007

### RESUMEN

Aproximadamente el 99.9% de la secuencia del ADN de dos individuos diferentes es la misma. Una proporción significativa de las diferencias encontradas en los individuos, es decir, sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidades a ciertas enfermedades, radica en el 0.1% de variación; a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en las secuencias de ADN. El estudio de estas variaciones tiene diversas aplicaciones en el campo de la medicina así como en el desarrollo de investigaciones biológicas y de evolución. Esta revisión describe los diferentes tipos de variaciones genéticas que presenta el genoma humano, así como su importancia y posible aplicación en la medicina.

#### Palabras clave:

Polimorfismos, polimorfismos de nucleótido sencillo, haplotipos, genoma humano.

**Key words:** Polymorphisms, single nucleotide polymorphism, haplotypes, human genome.

### INTRODUCCIÓN

El progreso alcanzado por la biología molecular ha dado gran impulso a nuevas técnicas. Uno de los grandes logros fue aprender a determinar la secuencia de bases de un fragmento de ADN. Más adelante, Saiki *et al*, aportaron las bases tecnológicas que revolucionaron esta disciplina, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).<sup>1</sup>

Apoiados en estas y otras técnicas, científicos estadounidenses, entre ellos Watson, iniciaron en

### ABSTRACT

About 99.9% of the DNA sequences of two different individuals are identical. A significant amount of the differences among individuals, that is, phenotypic differences and those responsible for susceptibility to pathology, lie within that variation of 0.1%. These genetic variations are known as genetic polymorphisms, representing differences in the sequences of DNA. The study of these variations in the areas of biology and evolution can provide information for different applications in medicine. Therefore, the objective of the present review is to describe the different types of genetic variations present in the human genome as well as their importance and possible applications in medicine.

213

1990 el Proyecto del Genoma Humano, cuyo objetivo era descifrar su secuencia completa; en el año 2001 y con la ayuda de Alemania, Canadá, Francia, Reino Unido y Japón, se publicó el primer borrador de la secuencia del genoma humano;<sup>2,3</sup> en 2003, se presentó un nuevo borrador que contenía el 99% de la secuencia del genoma. A partir de este proyecto se conoce que el genoma humano contiene entre 30,000 y 35,000 genes, lejos de los 100,000 postulados en un principio, y que sólo alrededor del 5% participa

en la codificación de información, mientras que la función del resto es hasta ahora desconocida. Por otra parte, se reveló la existencia de aproximadamente 10 millones de polimorfismos de nucleótido sencillo (PNS o SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*).<sup>4</sup>

Cabe mencionar que la variabilidad fenotípica de cada individuo, así como la susceptibilidad o la resistencia individual a distintas enfermedades radica principalmente en los SNP's, y en menor grado a inserciones, deleciones, secuencias repetidas y/o re-arreglos cromosómicos, debido a que el genoma humano no es una estructura pasiva; al contrario, el ADN está expuesto a un sin número de alteraciones que pueden dar como resultado la aparición de enfermedades. Estas alteraciones genéticas pueden ser grandes reorganizaciones cromosómicas, así como duplicaciones o deleciones de fragmentos y hasta de cromosomas enteros. Por otra parte, las modificaciones más frecuentes son llevadas a cabo en uno o en pocos nucleótidos.

Estos cambios en el ADN son llamados mutaciones, los cuales pueden ser originados por errores en los mecanismos de replicación y reparación del DNA, así como por factores ambientales. Así, las mutaciones pueden tener efectos deletéreos y causar enfermedades,<sup>5</sup> mutaciones que dan lugar a lo que se conoce como polimorfismos, los cuales proveen variación alélica entre individuos y diversidad de la misma especie. Un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1%. Hay varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas), pero los más frecuentes son los SNP's.

Las aplicaciones del estudio de los polimorfismos son diversas; por un lado sirven para tratar de explicar el origen de las poblaciones y así reconstruir parte de la historia evolutiva. Por otro, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense y en el estudio de las enfermedades multigénicas. Su estudio ha servido de pauta para la creación de nuevas disciplinas como la ecogenética y la farmacogenética; la primera define las bases genéticas de las diferencias individuales en respuesta a los factores ambientales, mientras que la segunda se centra en la definición de las

diferencias individuales en respuesta a un tratamiento farmacológico.<sup>6</sup>

## POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIPO SENCILLO (SNP)

Como se mencionó, los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Las diferentes formas de los polimorfismos (llamados "alelos") son más frecuentes que las mutaciones, esto es, en una frecuencia mayor al 1%. La gran mayoría de los SNP's tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o "silvestre" y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente.

Actualmente, en el "dbSNP" (base pública de datos de PNS, dbSNP's por sus siglas en inglés) se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de ADN.<sup>7,8</sup> Se describe que los SNP's se presentan uno cada 200 pares de bases en el genoma humano. Basados en ello, se esperaría que existieran aproximadamente 6 millones de SNP's en el genoma humano, muchos de los cuales ya han sido descritos en el dbSNP.<sup>9</sup> Los SNP's pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido; a este tipo de SNP's les conoce como "no sinónimos". Puesto que este tipo de SNP's afecta directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones.<sup>10</sup>

Asimismo, existen variaciones funcionales que pueden producir alguna enfermedad o susceptibilidad a ésta, pueden estar localizados en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de "splicing" (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intra-genéticas.<sup>11,12</sup>

Otro tipo de SNP's son los llamados "sinónimos" (o silenciosos) los cuales no alteran la conformación del gen; sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido.<sup>13</sup>

Según su localización en el genoma, los SNP's se clasifican en: iSNP, si están localizados en regiones intrónicas; cSNP, en regiones codificantes (exones); rSNP, en regiones reguladoras, y gSNP, localizados en regiones intergenómicas. Los cSNP pueden estar representados por SNP's sinónimos (sSNP) o no sinónimos (nsSNP)<sup>14</sup> (Figura 1).

Un dato interesante de los SNP's es que, a diferencia de otro tipo de marcadores como los microsatelitales, presentan una tasa menor de mutación por lo que son de gran ayuda en estudios de genética de poblaciones para tratar de explicar fenómenos biológicos como la evolución de la raza humana.

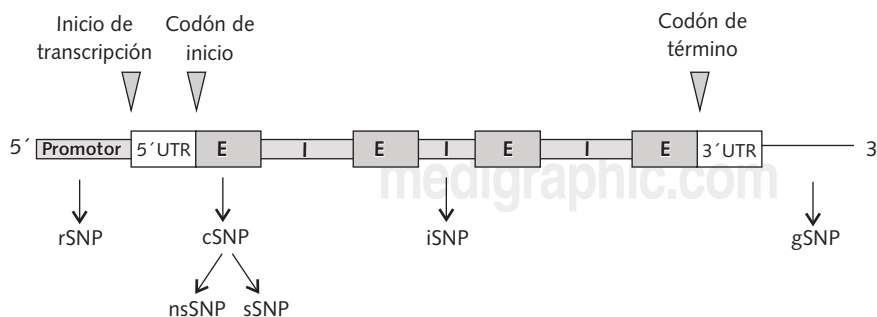
Un nivel adicional de variabilidad genética lo constituyen los haplotipos, los cuales están compuestos por un conjunto de SNP's a lo largo de un mismo cromosoma que son heredados como una unidad. La diferencia fundamental entre un haplotipo y los SNP's individuales, es que los alelos en los haplotipos son asignados a un cromosoma. Prácticamente cada individuo tendrá dos haplotipos para un fragmento del genoma, representados por los cromosomas paterno y materno. Estos haplotipos son de gran utilidad, ya que proporcionan información acerca de la recombinación, la cual es el intercambio físico del ADN durante la meiosis. La información obtenida de este tipo de datos es importante, ya que nos permite localizar mutaciones que pueden ser causantes de alguna enfermedad mediante métodos de análisis

de ligamiento (proceso explicado más adelante), además de tener un profundo efecto sobre la extensión de asociaciones estadísticas entre la presencia de dos SNP's en el genoma, conocido como desequilibrio de ligamiento (una propiedad de los estudios de asociación entre el genoma humano). Este desequilibrio de ligamiento puede ser entendido como una asociación entre los SNP's; es decir, los conocimientos del genotipo en un SNP puede predecir el genotipo de otro SNP si la asociación (desequilibrio de ligamiento) es alta entre estos dos SNP's.<sup>15</sup>

## POLIMORFISMOS DE SECUENCIAS REPETIDAS

Otro tipo de polimorfismos son los de secuencias repetidas, con una mayor aplicación en el diagnóstico genético y son conocidos como VNTR-microssatélites y VNTR-microssatélites o STR (del inglés, short tandem repeats). En ambos casos presentan un número variable de repeticiones en tándem (VNTR del inglés, variable number of tandem repeats).

Los minisatélites son loci que corresponden a secuencias de ADN de unas pocas decenas de nucleótidos repetidas en tándem. El número de dichas repeticiones varía de cromosoma a cromosoma, de forma que en un cromosoma el número de repeticiones en tándem puede ser de 10, en otro de 15, en otro de 22, etc. La singularidad más especial de este tipo de polimorfismos está en que cada loci puede presentar muchos alelos distintos (tantos como repeticiones), sin embargo, presentan el inconveniente de que no están distribuidos por todo el genoma y sólo pueden ser utilizados en el diagnóstico de un número muy



(E: Exones; I: Intrones; UTR: Regiones no codificantes).

**Figura 1.** Clasificación de SNP's de acuerdo con su localización en el genoma.

reducido de enfermedades. Los VNTR-minisatélites han encontrado su máxima aplicación en la determinación de la paternidad y en los protocolos de identificación genética en el ámbito judicial. Cuando se habla de huellas dactilares del ADN se está hablando de este tipo de polimorfismo.

Los VNTR-microsatélites son por excelencia los polimorfismos anónimos utilizados en el diagnóstico genético. Corresponden a la repetición en tándem de secuencias de entre 2 y 5 nucleótidos. Los microsatélites presentan dos características que los hacen ideales para su uso. En primer lugar, están distribuidos de forma casi homogénea por todo el genoma y en segundo, presentan un número elevado de alelos con frecuencias similares entre sí, de forma que la probabilidad de que un individuo sea heterocigoto es muy elevada (presentan una alta heterocigosis).<sup>16</sup>

### APLICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

El estudio de los polimorfismos tiene muchas aplicaciones en medicina, investigaciones biológicas y procesos jurídicos. En algunos casos las enfermedades genéticas pueden ser causadas por polimorfismos. De esta forma, los investigadores pueden usar los polimorfismos como marcadores de ciertas enfermedades, por ejemplo, si el presentar ciertos polimorfismos puede ser causal de riesgo para el desarrollo o progresión de alguna enfermedad. Los polimorfismos localizados cerca de un "gen candidato" pueden ser usados para hallar el gen por sí mismo a través de un mapeo genético. En este proceso el investigador está en búsqueda de polimorfismos que son heredados junto con la enfermedad, tratando de delimitar estos polimorfismos en regiones más y más pequeñas del cromosoma. Así, la región del cromosoma implicada en la enfermedad puede ser progresivamente delimitada, y el gen responsable finalmente puede ser localizado.

Los polimorfismos genéticos pueden ser usados como marcadores para ayudar a esclarecer ciertos patrones y/o procesos biológicos; además, pueden establecer parentescos. También se puede determinar la cantidad de entrecruzamiento entre diferentes grupos de la misma especie (flujo genético), y la información ser usada para identificar poblaciones únicas, potencialmente impor-

tante para la sobrevivencia de la especie. Puede no ser claro si dos grupos distintos de organismos deben ser clasificados como de diferentes especies y el comparar los polimorfismos genéticos de los dos grupos puede ayudar a su clasificación.

De igual forma, si se analizan suficientes polimorfismos, es posible distinguir distintos individuos con un alto grado de confianza. Este método es conocido como "huellas de ADN" y representa una herramienta importante en medicina forense y en procesos jurídicos. El genotipo de una persona o su huella de ADN, puede ser determinado a partir de muestras muy pequeñas (cabello, sangre, células de la piel, etc.). El genotipo de la muestra encontrada puede ser comparado con el genotipo del individuo "sospechoso". También, el análisis de los polimorfismos puede ayudar a probar la paternidad en situaciones de disputa.

### SNP Y ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN A ENFERMEDADES

Los estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades; a partir de esto han surgido pruebas directas e indirectas para el estudio de genes candidatos.

En un estudio de prueba directa, el supuesto SNP responsable de una enfermedad es genotipificado directamente. El reto de este tipo de estudios es predecir o determinar *a priori* cuáles SNP's son los responsables del fenotipo de interés. Muchas de las veces se sospecha de un SNP, si éste es uno no sinónimo (nsSNP); es decir, si el cSNP cambia el aminoácido en la proteína del gen de interés.

Los estudios indirectos de asociación genética difieren de las pruebas directas porque el estudio de los SNP's no son probados directamente, pues este tipo de estudios se basa en un análisis de ligamiento genético el cual utiliza "marcadores neutrales", y no hace predicciones sobre la localización del gen responsable de la enfermedad en estudio. Los estudios de asociación indirecta son más frecuentes en estudios de casos-control.<sup>17</sup>

A partir de las pruebas indirectas existen dos estrategias que han sido utilizadas para identificar los genes y los polimorfismos que están implicados con el desarrollo de ciertas enfermeda-

des: el análisis de ligamiento y estudios de asociación de genes candidatos. El análisis de ligamiento requiere el reclutamiento de familias afectadas, mientras que el estudio de genes candidatos es probado por estudios de asociación de sujetos no relacionados.

### Análisis de ligamiento

El análisis de ligamiento o escaneo genómico es un método en el cual se hace una búsqueda aleatoria en el genoma para tratar de encontrar los genes asociados a una enfermedad.

Este tipo de estudios requiere de cuando menos dos generaciones de las familias afectadas. Posteriormente cada miembro de la familia es genotipificado para marcadores de ADN (polimorfismos) que están esparcidos a lo largo del genoma; a partir de esto se determina cuáles marcadores son heredados más frecuentemente con la enfermedad. Los genes son identificados por separado y se determina su posición en el genoma; al aproximarse a la región del genoma identificado, el reto es encontrar las mutaciones responsables del fenotipo. Una ventaja de este método es que se pueden encontrar nuevos genes implicados en la patogénesis de la enfermedad y no se limita a la búsqueda de polimorfismos en genes que se sabe son causantes de ella.

A la fecha, el desarrollo de estos estudios es vasto; entre ellos, encontramos los realizados en artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria, sistémica y crónica con un componente genético complejo, donde se cree que la enfermedad tiene una patogénesis autoinmune, aunque la etiología precisa se desconoce aún. La asociación de HLA con este padecimiento es conocida y se ha confirmado en múltiples estudios de mapeo genómico;<sup>18-20</sup> asimismo, se han buscado y encontrado nuevos genes involucrados en la susceptibilidad a la enfermedad, que no pertenezcan al HLA.<sup>21</sup>

Otro ejemplo son los estudios realizados recientemente sobre la predisposición genética a tuberculosis pulmonar. Se ha realizado un número considerable de estudios de asociación genética, pero sólo algunos son reproducibles. Los resultados más consistentes son los que implican HLA de clase II y alelos de NRAMP1 y

MCP1.<sup>22-24</sup> Debido a esto, recién se llevó a cabo un estudio de mapeo geonómico donde se encontró una fuerte asociación en la región cromosómica 8q12-q13.<sup>25</sup>

### Estudios de asociación genética (Tabla I)

En éstos se buscan polimorfismos individuales de genes implicados en la patogénesis de la enfermedad y, así, determinar si existe algún tipo de relación con ella, para lo que primero se deben identificar genes candidatos que se crea o se sepa son importantes en la patogénesis de una condición. Este tipo de genes pueden ser candidatos debido a un extenso estudio de la enfermedad y/o comparando los niveles de expresión génica en tejidos normales y enfermos (a través de microarreglos de RNA mensajero o PCR en tiempo real); el siguiente paso es identificar los diferentes polimorfismos sobre el gen que pudieran estar afectando su función, y finalmente examinar si los polimorfismos elegidos ocurren más frecuentemente en individuos que tienen la enfermedad con respecto a una población control, o si este tipo de variación predice el desarrollo de la enfermedad en un estudio de cohorte.

Una de las ventajas en este tipo de estudios de asociación es que los sujetos de estudio son individuos no relacionados, y no se requieren datos fenotípicos ni genotípicos de múltiples generaciones; sin embargo, una asociación positiva puede no ser debida siempre a un papel causal del polimorfismo. Por ejemplo, puede haber asociaciones de falsos-positivos si un grupo étnico diferente (con distinta frecuencia del polimorfismo) está sobrerrepresentado en el grupo de casos o control.<sup>40</sup> Algunos de los estudios de asociación realizados en enfermedades pulmonares aparecen en la Tabla I.

### IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS

Para identificar factores genéticos asociados con determinado fenotipo, se busca perfeccionar las herramientas de estudio. A continuación se mencionan algunos métodos que se han desarrollado con el objeto de identificar nuevos polimorfismos, así como para la discriminación alélica (identificación de polimorfismos ya conocidos).



**Tabla I.** Ejemplos de estudios de asociación en enfermedades pulmonares.

Enfermedad	Genes asociados	Referencias
Asma	Receptor $\beta$ -2-adrenérgico, CD14, IL-13	26-28
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	TNF- $\alpha$ , oxigenasa-1	29-31
Fibrosis quística	HLA clase II, $\alpha$ -1 antitripsina	32,33
Neumonitis por hipersensibilidad	TNF- $\alpha$	34
Fibrosis pulmonar idiopática	TNF- $\alpha$ , IL-6, MHC, IL-1	35-37
Sarcoidosis	HLA	38
Silicosis	IL-1	39

### Nuevos polimorfismos

La secuenciación del ADN es la prueba de oro para la detección de nuevos polimorfismos, pero resulta muy costosa, por lo que se han desarrollado diferentes métodos para realizar este tipo de escaneo;<sup>41</sup> la mayoría explota las diferencias que existen entre los no apareamientos de cadenas heteroduplex de ADN y de los apareamientos de cadenas homoduplex de ADN. Entre ellos encontramos los siguientes:

#### *D/TGGE (Geles de electroforesis en gradiente desnaturalizante/térmico)*

Analiza el polimorfismo a través de la estabilidad, a distintas condiciones desnaturalizantes o a diferentes temperaturas del DNA amplificado. Su principal problema reside en las dificultades técnicas para mantener estables las condiciones experimentales.<sup>42</sup>

#### *SSCP (Polimorfismo de conformaciones de cadena sencilla)*

Técnica basada en el análisis del polimorfismo a través de las diferencias conformacionales de fragmentos de DNA de cadena sencilla. Las distintas conformaciones son detectables como un cambio de movilidad en geles de poliacrilamida no desnaturalizante. Es especialmente útil cuando las reacciones de PCR producen bandas de DNA de gran tamaño, o bien bandas de tamaño muy parecido; puede llegar a distinguir cambios de pocos nucleótidos.<sup>43</sup>

#### *DHPLC (Cromatografía líquida de alta resolución)*

La técnica es una variante del análisis heteroduplex. En lugar de usar un gel y separar los frag-

mentos de ADN por electroforesis, se utilizan una resina modificada y el HPLC. Cuando se separan los fragmentos de ADN a altas temperaturas, se realinean los fragmentos y se pueden distinguir las cadenas heteroduplex de las homoduplex mediante el tiempo de retención en la columna.<sup>44</sup>

#### *Secuenciación por hibridación*

Cuando se conoce la secuencia de un fragmento de ADN, es posible colocar un juego de oligonucleótidos cortos representando el fragmento completo de ADN o "chip" de ADN. Debido a que se conoce la secuencia de los oligonucleótidos en cada posición, se puede inferir la secuencia de ADN de una prueba de ADN marcada con fluorescencia, analizando el patrón de hibridación. Actualmente se pueden escanear más de 15kb de ADN en un chip conteniendo 40,000 oligonucleótidos. Este método es uno de los mejores para analizar fragmentos grandes de ADN.<sup>45</sup>

### Discriminación alélica

No existe el método ideal; los usados actualmente emplean cuatro mecanismos generales para llevar a cabo la discriminación alélica: hibridación alelo-específica, ligación de oligonucleótidos alelo-específicos, incorporación de oligonucleótidos alelo-específicos y corte enzimático alelo-específico.<sup>46</sup> Algunos ejemplos de estas técnicas son:

PCR-RFLP (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción).

Se usan enzimas de restricción que cortan secuencias específicas de ADN; es decir, un fragmento de ADN amplificado por PCR se somete a digestión con una endonucleasa, ésta tendrá un sitio de corte específico y las variaciones altera-

rán este patrón de corte; dando como resultado un patrón diferente de migración que puede ser visualizado mediante el corrimiento de estos fragmentos en geles de agarosa, comparando y distinguiendo los distintos genotipos.

#### Hibridación

En ésta se diseñan dos pruebas alelo-específicas para hibridar a una secuencia blanco, solamente cuando éstas sean totalmente complementarias. Cuando las sondas alelo-específicas son inmovilizadas sobre un soporte, se capturan las muestras de ADN y se visualizan los eventos de hibridación detectando una marca fluorescente. La hibridación es una de las formas más fáciles para la discriminación alélica<sup>47</sup> ya que no se usan enzimas.

*Extensión de oligonucleótidos (Primer extensión).* Prueba muy sólida y flexible de discriminación alélica. Hay tres categorías de variaciones del método, basadas en que la ADN polimerasa puede incorporar nucleósidos específicos complementarios a la secuencia del templado: a) secuenciación (incorporación de nucleótidos alelo-específicos), en donde se determina la identidad de la base polimórfica en el ADN blanco, b) prueba de PCR alelo-específica, donde se usa la ADN polimerasa para amplificar el ADN blanco solamente si los oligos de PCR alelo-específico son perfectamente complementarios a la secuencia blanco, y c) prueba de "primer extensión" alelo-específica, donde una o muy pocas bases son incorporadas solamente si el extremo 3' de la sonda reconoce la base polimórfica en la secuencia blanco.<sup>48-50</sup>

#### PCR en tiempo real

Método basado en la aplicación de la técnica de PCR y en la creación de dos sondas alelo-específicas, las cuales emiten una señal fluorescente al unirse al templado. Este tipo de análisis es más utilizado hoy en día porque ya existen sondas prediseñadas para un sinnúmero de polimorfismos, ya descritos.<sup>51,52</sup>

#### CONCLUSIONES

El estudio de los polimorfismos genéticos va en aumento. A partir de los datos generados del es-

tudio de los polimorfismos se han logrado entender parcialmente los mecanismos de susceptibilidad a ciertas enfermedades. Con el desarrollo de nuevas metodologías a nivel de ADN y celular, se espera que los estudios de asociación aceleren el entendimiento de enfermedades relacionadas con ciertos genes, y establecer la relevancia de un polimorfismo en el contexto funcional.

En los últimos años se están desarrollando nuevas metodologías para identificar los polimorfismos funcionales que afecten o regulen la expresión genética. Por otra parte, es necesario estudiar el papel del medio ambiente y su influencia en los polimorfismos genéticos. En este contexto, se han demostrado asociaciones de cierto gen con una enfermedad, que son potencializados dependiendo de algunas condiciones ambientales.

Finalmente, es necesario un nuevo entendimiento de la biología de las enfermedades comunes para ligar, de una manera más completa, genotipos individuales a fenotipos complejos. El Proyecto Internacional del HapMap (proyecto que desarrolla un mapa de haplotipos del genoma humano) busca proveer muchas de las herramientas que actualmente son necesarias en el estudio del genoma humano.

#### REFERENCIAS

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* Science 1985;230:1350-1354.
2. Lander ES, Linton LM, Birren N, et al; International Human Genome Sequencing Consortium. *Initial sequencing and analysis of the human genome.* Nature 2001;409:860-921.
3. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. *The sequence of the human genome.* Science 2001;291:1304-1351.
4. International Human Genome Sequencing Consortium. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome.* Nature 2004;431:931-945.
5. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. *Creation of human tumor cells with defined genetic elements.* Nature 1999;400:464-468.
6. Nebert DW. *Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist?* Am J Hum Genet 1997;60:265-271.
7. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K. *dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation.* Genome Res 1999;9:677-679.

8. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. *dbSNP: the NCBI database of genetic variation*. *Nucleic Acids Res* 2001;29:308-311.
9. Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A. *Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation*. *Science* 1997;278:1580-1581.
10. Botstein D, Risch N. *Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease*. *Nat Genet* 2003;33 Suppl:228-237.
11. Lin MT, Storer B, Martin PJ, et al. *Relation of an interleukin-10 promoter polymorphism to graft-versus-host disease and survival after hematopoietic-cell transplantation*. *N Engl J Med* 2003;349:2201-2210.
12. Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. *Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript*. *Oncogene* 1995;11:1005-1011.
13. Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, et al. *Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor*. *Hum Mol Genet* 2003;12:205-216.
14. Cargill M, Altshuler D, Ireland J, et al. *Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes*. *Nat Genet* 1999;22:231-238.
15. Crawford DC, Nickerson DA. *Definition and clinical importance of haplotypes*. *Annu Rev Med* 2005;56:303-320.
16. Weber JL, Wong C. *Mutation of human short tandem repeats*. *Hum Mol Genet* 1993;2:1123-1128.
17. Crawford DC, Akey DT, Nickerson DA. *The patterns of natural variation in human genes*. *Annu Rev Genomics Genet* 2005;6:287-312.
18. Cornelis F, Faure S, Martinez M, et al. *New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10746-10750.
19. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, et al. *A genomewide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases*. *Am J Hum Genet* 2001;68:927-936.
20. MacKay K, Eyre S, Myerscough A, et al. *Whole-genome linkage analysis of rheumatoid arthritis susceptibility loci in 252 affected sibling pairs in the United Kingdom*. *Arthritis Rheum* 2002;46:632-639.
21. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, et al. *Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes: a replication study and combined analysis of 512 multicase families*. *Arthritis Rheum* 2003;48:906-916.
22. Goldfeld AE, Delgado JC, Thim S, et al. *Association of an HLA-DQ allele with clinical tuberculosis*. *JAMA* 1998;279:226-228.
23. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. *Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans*. *N Engl J Med* 1998;338:640-644.
24. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, et al. *A functional promoter polymorphism in monocyte chemoattractant protein-1 is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis*. *J Exp Med* 2005;202:1649-1658.
25. Baghdadi JE, Orlova M, Alter A, et al. *An autosomal dominant major gene confers predisposition to pulmonary tuberculosis in adults*. *J Exp Med* 2006;203:1679-1684.
26. Israel E, Drazen JM, Liggett SB, et al. *Effect of polymorphism of the beta(2)-adrenergic receptor on response to regular use of albuterol in asthma*. *Int Arch Allergy Immunol* 2001;124:183-186.
27. Koppelman GH, Reijmerink NE, Colin Stine O, et al. *Association of a promoter polymorphism of the CD14 gene and atopy*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:965-969.
28. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, et al. *Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma*. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:980-987.
29. Higham MA, Pride NB, Alikhan A, Morrell NW. *Tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphism in chronic obstructive pulmonary disease*. *Eur Respir J* 2000;15:281-284.
30. Keatings VM, Cave SJ, Henry MJ, et al. *A polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may predispose to a poor prognosis in COPD*. *Chest* 2000;118:971-975.
31. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, et al. *Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema*. *Am J Hum Genet* 2000;66:187-195.
32. Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava J, Dusser D, Hubert D. *HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype*. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(5 Pt 1):1464-1468.
33. Henry MT, Cave S, Rendall J, et al. *An alpha1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis*. *Eur J Hum Genet* 2001;9:273-278.
34. Schaaf BM, Seitzer U, Pravica V, Aries SP, Zabel P. *Tumor necrosis factor-alpha-308 promoter gene polymorphism and increased tumor necrosis factor serum bioactivity in farmer's lung patients*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:379-382.
35. Pantelidis P, Fanning GC, Wells AU, Welsh KI, Du Bois RM. *Analysis of tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, tumor necrosis factor receptor II, and interleukin-6 polymorphisms in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1432-1436.
36. Falfan-Valencia, Camarena A, Juarez A, et al. *Major histocompatibility complex and alveolar epithelial apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Hum Genet* 2005;118:235-244.
37. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, et al. *Correlation of IL-1alpha and IL-4 gene polymorphisms and clinical parameters in idiopathic pulmonary fibrosis*. *Scand J Immunol* 2007;65:265-270.
38. Martinetti M, Dugoujon JM, Tinelli C, et al. *HLA-Gm/kappam interaction in sarcoidosis. Suggestions for a complex genetic structure*. *Eur Respir J* 2000;16:74-80.
39. Petrek M, Drabek J, Kolek V, et al. *CC chemokine receptor gene polymorphisms in Czech patients with pulmonary sarcoidosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(3 Pt 1):1000-1003.



40. Pritchard JK, Rosenberg NA. *Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies*. *Am J Hum Genet* 1999;65:220-228.
41. Mifflin TE, Hamilton SD, Kramear GW, Felder RA. *Robotics and automation in genomics laboratories*. In: Galas DJ, McCormack SJ, editors. *Genomic technologies: present and future*. Wymondham, England: Caister Academic Press;2002.p.313-343.
42. Fischer SG, Lerman LS. *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:1579-1583.
43. Hayashi K. *PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA*. *PCR Methods Appl* 1991;1:34-38.
44. Underhill PA, Jin L, Lin AA, et al. *Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography*. *Genome Res* 1997;7:996-1005.
45. Halushka MK, Fan JB, Bentley K, et al. *Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis*. *Nat Genet* 1999;22:239-247.
46. Kwok PY, Carlson C, Yager TD, Ankener W, Nickerson DA. *Comparative analysis of human DNA variations by fluorescence-based sequencing of PCR products*. *Genomics* 1994;23:138-144.
47. Livak KJ. *Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay*. *Genet Anal* 1999;14:143-149.
48. Chen J, Iannone MA, Li MS, et al. *A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension*. *Genome Res* 2000;10:549-557.
49. Germer S, Higuchi R. *Single-tube genotyping without oligonucleotide probes*. *Genome Res* 1999;9:72-78.
50. Pastinen T, Raitio M, Lindroos K, Tainola P, Peltonen L, Syvänen AC. *A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays*. *Genome Res* 2000;10:1031-1042.
51. Wong FL, Wang MK, Boo NY, Hamidah NH, Ainoon BO. *Rapid detection of the UGT1A1 single nucleotide polymorphism G211A using real-time PCR with Taqman minor groove binder probes*. *J Clin Lab Anal* 2007;21:167-172.
52. Yang CJ, Medley CD, Tan W. *Monitoring nucleic acids using molecular beacons*. *Curr Pharm Biotechnol* 2005;6:445-452.

**Correspondencia:**

Biól. Marco Antonio Checa Caratachea,  
Laboratorio de Biología Molecular,  
Unidad de Investigación. Instituto  
Nacional de Enfermedades  
Respiratorias Ismael Cosío Villegas.  
Calzada de Tlalpan 4502, colonia  
Sección XVI. México, DF., 14080.  
Correo electrónico:  
marc\_checa@yahoo.com