

Polimorfismo CYP1A1*2A e infertilidad en hombres de la región Caribe colombiana

CYP1A1*2A polymorphism and infertility in Colombian Caribbean male subjects

Grace Carreño Flórez¹, Ruth Escorcia Gamarra¹, Lourdes Varela Prieto², Carlos Silvera Redondo³, Ricardo Gutiérrez De Aguas⁴

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio fue investigar la asociación del polimorfismo CYP1A1*2A (T→C) y la infertilidad en una muestra de hombres del Caribe colombiano.

Materiales y Métodos: Se analizaron características macroscópicas y microscópicas de la muestra seminal de 31 hombres infértiles y 20 fértiles. La genotipificación del polimorfismo se realizó a partir de la técnica PCR-RFLP.

Resultados: Se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las características seminales microscópicas en ambos grupos. Además, se identificaron alteraciones en movilidad, concentración y/o morfología. Fueron identificados tres genotipos: TT, TC y CC. En los infértiles se presentaron 25 individuos con genotipo TT (80.6 %), 5 TC (16.1 %) y 1 CC (3.2 %), y en el grupo fértil 16 individuos presentaron genotipo TT (80.0 %), 4 TC (20.0 %) y 0 CC (0.0 %). La distribución genotípica se encontró en equilibrio Hardy - Weinberg en ambos grupos. El análisis de regresión logística mostró que no hubo asociación significativa entre el polimorfismo CYP1A1*2A y la infertilidad en hombres del Caribe colombiano ($p > 0.05$).

Conclusión: Estos resultados preliminares sugieren que el polimorfismo CYP1A1*2A no contribuye a la infertilidad masculina en hombres del Caribe colombiano. Sin embargo, son de gran importancia debido a que existe escasa información que asocie polimorfismos del gen CYP1A1 con la infertilidad masculina.

Palabras clave: CYP1A1, hidrocarburos aromáticos policíclicos, infertilidad masculina, parámetros seminales.

Fecha de recepción: 15 de julio de 2014
Fecha de aceptación: 8 de octubre de 2014

¹ Bióloga, Universidad del Atlántico. Barranquilla (Colombia). gcarrenoflorez@gmail.com, ryescorciag@gmail.com

² Grupo de Investigación en Inmunología y Biología Molecular, Universidad del Atlántico. Barranquilla (Colombia). lourdesvarela@mail.uniatlantico.edu.co

³ Grupo de Investigación en Genética y Medicina Molecular, Universidad del Norte. Barranquilla (Colombia). csilvera@uninorte.edu.co

⁴ Grupo de Investigación en Química y Biología, Universidad del Norte. Barranquilla (Colombia). rgutierr@uninorte.edu.co

Correspondencia: Ricardo Gutiérrez. Km 5, vía a Puerto Colombia. Barranquilla (Colombia). Fax. 5-3598852. rgutierr@uninorte.edu.co

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the association of CYP1A1*2A polymorphism (T→C substitution) with male infertility in Colombian Caribbean subjects.

Materials and Methods: Macroscopic and microscopic characteristics were analyzed in the semen sample of 31 infertile and 20 fertile men. The polymorphism was genotyped through PCR-RFLP.

Results: Both groups evidenced significant differences in microscopic characteristics ($p < 0.05$), as well as alterations in sperm motility, count and morphology. Three genotypes were identified: wild type homozygous (TT), heterozygous (TC) and variant homozygous (CC). 25 TT genotype (80.6%), 5 TC genotype (16.1%) and 1 CC genotype (3.2%) in infertile men, and 16 TT genotype (80.0%), 4 TC genotype (20.0%) and 0 CC genotype (0.0%) in fertile men were identified. In both infertile and fertile men, distributions of the genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium. Logistic regression analysis showed no significant association between CYP1A1*2A polymorphism and male infertility in Colombian Caribbean men ($p > 0.05$).

Conclusion: These preliminary results suggest that CYP1A1*2A polymorphism do not contribute to male infertility of Colombian Caribbean men. However, they are very important because there is limited information about CYP1A1 gene polymorphisms associated with male infertility..

Keywords: CYP1A1, polycyclic aromatic hydrocarbon, male infertility, seminal parameters.

INTRODUCCIÓN

La salud reproductiva masculina tuvo un deterioro en muchos países durante la segunda mitad del siglo XX (1, 2, 3, 4). Las posibles razones para explicar este hecho aún son desconocidas, sin embargo, entre las hipótesis presentadas se ha dado gran importancia a la posibilidad de que la exposición a contaminantes ambientales ejerza efectos adversos en el desarrollo y función de la salud reproductiva masculina (5, 6).

Entre estos contaminantes se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs o PAHs en inglés), agentes cancerígenos que debido a su estabilidad y carácter lipofílico se bioacumulan en el ecosistema, siendo detectados incluso en el tracto reproductor masculino (7).

La degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos es realizada por la enzima CYP1A1 (8), la cual corresponde a una enzima hemotiolada de 512 aminoácidos que interviene en la fase I de la bioactivación de xenobióticos, haciendo parte de un grupo de monooxigenasas que catalizan muchas reacciones envueltas en el metabolismo de compuestos endógenos, como esteroides, colesterol y otros lípidos; además de drogas y sustancias cancerígenas, tales como fenobarbitales y los ya mencionados hidrocarburos aromáticos (9, 10, 11). Si bien su función principal es transformar los xenobióticos en metabolitos fácilmente excretables, en algunos casos se producen especies reactivas que interactúan con el ADN, iniciando el proceso carcinogénico (12). De esta manera, la relación de los metabolitos reactivos de PAHs con los efectos tóxicos que presentan a nivel

reproductivo permiten que los polimorfismos genéticos de las enzimas extrahepáticas de fase I como la CYP1A1 sean candidatos interesantes para determinar la susceptibilidad individual de presentar problemas de fertilidad en hombres.

El polimorfismo CYP1A1*2A consiste en una sustitución de timina por citosina (TàC) en el nucleótido 3801 en la región 3' no codificadora rs4646903. Debido a que el polimorfismo 3801T/C se encuentra ubicado en la región no codificadora, originalmente se pensaba que cualquier tipo de consecuencias funcionales aparentes de la variante se debían a la relación con otros polimorfismos, como por ejemplo, aquellos presentes en la región codificadora o el receptor aril hidrocarbónico. De cualquier manera, los polimorfismos en las secuencias no codificadoras pueden influir en la función del gen, alterando el nivel, ubicación o tiempo de expresión del gen o la estabilidad del ARN mensajero (13).

Este polimorfismo ha sido asociado con infertilidad masculina en población caucásica y asiática (5, 13-15); por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar la asociación existente entre el polimorfismo CYP1A1*2A con las alteraciones en concentración, movilidad y/o morfología espermática de una muestra de hombres infértiles del Caribe colombiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

En este estudio descriptivo de corte transversal se analizaron muestras de sangre periférica y semen de 31 hombres infértiles y 20 fértiles del Caribe colombiano con el respectivo consentimiento informado. La muestra de infértiles se obtuvo de un cen-

tro de reproducción humana de la ciudad de Barranquilla y la muestra de fértiles de voluntarios. Los criterios de inclusión para los infértiles fueron: i) presentar deficiente cantidad y/o calidad espermática ii) ausencia de deleciones en la región AZF del cromosoma Y, probado por los correspondientes análisis moleculares. Los criterios de inclusión para los fértiles fueron: i) concentración, movilidad y morfología seminal dentro de los rangos normales según la OMS (16) y en lo posible fertilidad comprobada.

Análisis seminal

En el caso de los pacientes infértiles se utilizaron los espermogramas de sus respectivas consultas, y para los fértiles se analizó la muestra seminal en el laboratorio de Biología de la Universidad del Norte (Barranquilla, Colombia). Se registró la edad, días de abstinencia y el origen geográfico de la muestra. Se valoraron las características microscópicas: movilidad, concentración y morfología, y con base en esto se identificaron las alteraciones presentes en cada variable evaluada para dichos parámetros. Estos análisis se realizaron siguiendo las indicaciones del Manual de la OMS (16).

Análisis genotípico

Extracción de ADN: Se aisló ADN genómico utilizando el kit Ultra Clean Blood DNA Isolation (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, CA) y se cuantificó por medio de espectrofotometría (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA).

Genotipificación: Se realizó con la técnica PCR-RFLP descrita por Boyapatl *et al.* (17). Se amplificó un fragmento de 340pb por medio de los primers 5' CAGTGAAGAGGTGTAGC-CGCT 3' y 5' TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT 3'.

Para establecer los genotipos se utilizó la enzima MspI (New England, Biolabs Inc., MA, USA), la cual digiere el producto amplificado de 340pb en dos fragmentos: 200pb y 140pb si se encuentra el alelo polimórfico, mientras que permanece sin digerir cuando se encuentra el alelo silvestre. La identificación de los genotipos se realizó mediante electroforesis en agarosa al 2 %.

Análisis estadístico

Se determinaron los valores y alteraciones de movilidad, concentración y/o morfología espermática en los individuos infértiles y fértiles. Se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas por el método de conteo manual y se determinó el equilibrio Hardy-Weinberg mediante la prueba χ^2 . La asociación entre la presencia del polimorfismo y cada alteración espermática fue estimada mediante regresión logística binaria (IC = 95 %). Diferencias de $p < 0.05$ fueron consideradas como significati-

vas. Las pruebas mencionadas se realizaron utilizando el programa SPSS (versión 17).

RESULTADOS

Valoración de las características microscópicas de la muestra seminal

La edad y días de abstinencia de los pacientes infértiles y fértiles no tuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$). El promedio de edad correspondió a 30.33 ± 7.20 y 27.60 ± 7.63 años y el promedio de abstinencia fue de 4.11 ± 1.29 días y 3.32 ± 0.75 días, respectivamente.

De los 31 infértiles, 30 individuos presentaron astenozoospermia (96.77 %), 13 azoospermia (41.93 %), 11 oligozoospermia (35.48 %), 23 teratozoospermia (74.19 %), 10 oligoastenozoospermia y astenoteratozoospermia (32.26 %) y 7 oligoteratozoospermia y oligoastenoteratozoospermia (22.58 %) (tabla 1).

Tabla 1. Alteraciones en la movilidad, concentración y morfología espermática en hombres infértiles de la región norte de Colombia

Muestra	Alteración	n / %	Concentración (millones/ml)	Movilidad (%)	Morfología (%)
Total infértiles		31/100	14.4 ± 22.8	15.1 ± 22.26	7.9 ± 17.2
Alteración en movilidad	Astenozoospermia	30/96.8	12.7 ± 22.9	6.4 ± 9.2	5.1 ± 9.5
Alteración en concentración	Azoospermia	13 / 41.9	0.0	0.0	0.0
	Oligozoospermia	11 / 35.5	8.5 ± 7.3	12.9 ± 12.6	9.0 ± 13.4
Alteración en morfología	Teratozoospermia	23 / 74.2	10.4 ± 18.6	6.4 ± 9.5	1.1 ± 3.0
Alteraciones combinadas	Oligoastenozoospermia	10/32.3	7.6 ± 7.0	19.9 ± 16.6	8.3 ± 13.9
	Astenoteratozoospermia	10/32.3	17.8 ± 22.2	23.1 ± 20.4	2.7 ± 4.3
	Oligoteratozoospermia	7/22.6	11.9 ± 11.3	22.6 ± 17.0	2.1 ± 3.9
	Oligoastenoteratozoospermia	7/22.6	7.4 ± 7.8	17.7 ± 15.3	2.3 ± 4.4
Total fértiles		20	65.5 ± 55.8	67.9 ± 15.1	15.6 ± 14.4

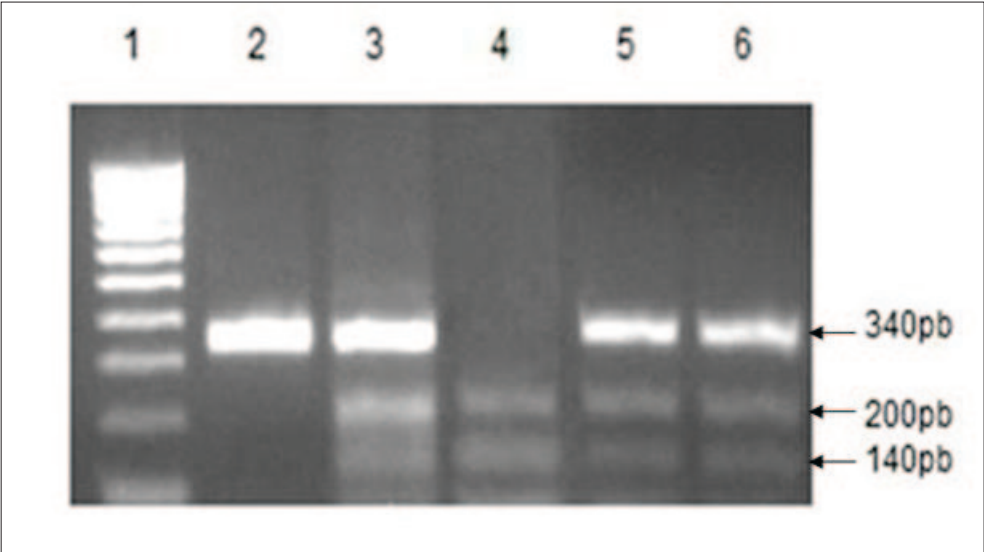
Fuente: datos tabulados por los autores.

Determinación de genotipos, frecuencias genotípicas y frecuencias alélicas del polimorfismo CYP1A1*2A

Se identificaron tres genotipos: homocigoto silvestre (TT), heterocigoto (TC) y homocigoto polimórfico (CC) (figura 1).

En los pacientes infértiles se encontró una frecuencia de 80.6 % para el genotipo TT,

16.1 % para el genotipo TC y 3.2 % para el genotipo CC. Por otra parte, las frecuencias para los individuos fértiles fueron 80.0 % para el genotipo TT, 20.0 % para el genotipo TC y ausencia del genotipo CC. En cuanto a la frecuencia alélica del polimorfismo, se encontró una frecuencia de 0.113 en los infértiles y 0.100 en los fértiles. En ambos grupos la distribución genotípica se encontró en equilibrio Hardy-Weinberg ($p>0.05$) (tabla 2).



Fuente: propia de los autores.

Figura 1. Análisis del polimorfismo CYP1A1*2A. La línea 1 representa el marcador de peso molecular de 100pb, la línea 2 representa el genotipo TT (fragmento de 340pb), las líneas 3, 5 y 6 representan el genotipo TC (fragmentos de 340pb, 200pb y 140pb) y la línea 4 representa el genotipo CC (140pb y 200pb).

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo CYP1A1*2A en individuos infértiles y fértiles

CYP1A1*2A	Infértiles	Fértiles	Valor p
	n=31	n=20	
	n / %	n / %	
TT	25 / 80.60	16 / 80.00	0.613
TC	5 / 16.10	4 / 20.00	0.805
CC	1 / 3.20	0 / 0.00	0.482
alelo T	0.887	0.900	
alelo C	0.113	0.100	

Fuente: datos tabulados por los autores.

Asociación entre el alelo polimórfico CYP1A1*2A e infertilidad masculina

El polimorfismo CYP1A1*2A se identificó en 6 hombres infértiles, 5 con genotipo TC y 1 con genotipo CC (19.35%), y en 4 hombres fértiles con genotipo TC (20.00 %).

El análisis de regresión logística mostró que la presencia del alelo polimórfico estuvo incrementada de forma no significativa en los pacientes con azoospermia (OR= 1.200, IC_{95%}=0.221-6.521) y en los pacientes con teratozoospermia (OR= 1.11, IC_{95%}=0.254-4.867). Por otro lado, la presencia del alelo polimórfico tuvo una disminución no significativa en los pacientes con oligoasteno-

zoospermia y astenoteratozoospermia (OR= 0.444, IC_{95%}=0.043-4.607), en los pacientes con oligoteratozoospermia y oligoastenoteratozoospermia (OR= 0.667, IC_{95%}=0.061-7.230), en los pacientes con astenozoospermia (OR= 0.800, IC_{95%}= 0.186-3.434) y, por último, en los pacientes con oligozoospermia (OR= 0.889, IC_{95%}= 0.135-5.846) (tabla 3).

La asociación entre el polimorfismo CYP1A1*2A y las alteraciones en movilidad, concentración y/o morfología no fueron significativas (p>0.05). De esta manera, se evidencia que la presencia de este polimorfismo en los hombres infértiles de la región norte de Colombia no muestra relación con sus problemas de fertilidad.

Tabla 3. Análisis de regresión logística (OR e IC95%) para los hombres infértiles con el alelo polimórfico

	n	CYP1A1*2A obs/ esp	OR	IC95%	Valor p
Total de Infértiles	31	6 / 6.1	1.042	0.254-4.276	0.955
Astenozoospermia	30	5 / 5.4	0.800	0.186-3.434	0.764
Azoospermia	13	3 / 2.8	1.200	0.221-6.521	0.833
Oligozoospermia	11	2 / 2.1	0.889	0.135-5.846	0.902
Teratozoospermia	23	5 / 4.8	1.111	0.254-4.867	0.889
Oligoastenozoospermia	10	1 / 1.7	0.444	0.043-4.607	0.497
Astenoteratozoospermia	10	1 / 1.7	0.444	0.043-4.607	0.497
Oligoteratozoospermia	7	1 / 1.3	0.667	0.061-7.230	0.739
Oligoastenoteratozoospermia	7	1 / 1.3	0.667	0.061-7.230	0.739

Fuente: datos tabulados por los autores.

DISCUSIÓN

La calidad seminal está definida por una amplia variedad de características tanto microscópicas como macroscópicas, entre las que se encuentran el volumen, el olor, la viscosidad, la concentración, la movilidad

y la morfología. Sin embargo, los estudios cuyo objetivo es asociar el estado seminal de hombres con el polimorfismo CYP1A1*2A enfatizan en uno de los aspectos de la calidad seminal, como es el caso de Lu *et al.* (13), quienes consideran solo la azoospermia u oligozoospermia severa, o el caso de Fritsche

et al. (14) y Vani et al. (15), quienes consideran algunos parámetros.

La expresión de la enzima CYP1A1 depende directamente del nivel de exposición a sus posibles sustratos, entre los que se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos, debido a que a mayor concentración de dicha enzima se incrementa la probabilidad de formación de aductos de ADN, cuya presencia ha sido reportada en espermatozoides humanos, siendo sugerida como un marcador de daño en el ADN y de la fertilidad masculina (18).

El polimorfismo CYP1A1*2A ha sido relacionado con el aumento de la expresión del gen en respuesta al incremento de los agentes contaminantes (8). Sin embargo, en un estudio realizado en una población de americanos heterogéneos la presencia de este polimorfismo no presentó efectos en la inducción de CYP1A1 (19). Esto permitiría pensar que la baja frecuencia del polimorfismo CYP1A1*2A en la muestra de hombres de la región Caribe podría estar relacionada con la baja carga contaminante ambiental.

El grupo de hombres analizados en este estudio pertenecen a la región Caribe colombiana, sin embargo, se conoce la composición triétnica de la población colombiana en general, que tiene influencia caucásica, africana y amerindia, aunque el aporte genético de cada uno de dichos grupos étnicos pueda variar en las distintas regiones del país, debido a los procesos históricos de distribución de las poblaciones (20).

Las variaciones en la distribución de los genotipos tienen una estrecha relación con el grupo étnico. En efecto, los resultados obtenidos en este estudio difieren de los obtenidos en caucásicos, chinos, hindúes e iraníes (13-15, 21). La presencia de polimorfismos en los

distintos grupos poblacionales influye en la susceptibilidad genética a enfermedades, siendo relacionada con la exposición a agentes que desencadenan la expresión de la enzima CYP1A1.

En este estudio se encontró un incremento no significativo ($p > 0.05$) del polimorfismo CYP1A1*2A en hombres azoospermicos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Lu et al. (13) en una población china.

Lu et al. (13) reportaron asociación entre el polimorfismo CYP1A1*2A y la infertilidad masculina por medio de los haplotipos formados con el polimorfismo CYP1A1*2C, de tal manera que es posible que su asociación con la infertilidad masculina se encuentre en dependencia de la relación con otros polimorfismos como el *2C.

Cabe anotar que estos resultados son de gran importancia y gran utilidad debido a que existe escasa información que asocie polimorfismos del gen CYP1A1 con la infertilidad masculina y es el primer estudio de este tipo realizado en una muestra de hombres del Caribe colombiano.

En conclusión, el análisis de regresión logística mostró asociaciones no significativas entre la presencia del polimorfismo CYP1A1*2A y las alteraciones en movilidad, concentración y/o morfología espermática de hombres infértiles del Caribe colombiano.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los voluntarios que aceptaron donar muestras y a los doctores Guido Parra, Fernando Vásquez y Gisela Jiménez por la colaboración con los pacientes.

Conflicto de intereses: ninguno.

Financiación: Universidad del Norte.

REFERENCIAS

1. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouanne P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Eng. J. Med* 1995; 332: 281-285.
2. Irvine DS, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken RJ. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *BMJ* 1996; 312: 467-471.
3. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ et al. Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. *Environ. Health Perspect* 1996; 104 (Supl 4): 741-803.
4. Van Waelegheem K, De Clercq N, Vermeulen L, Schoonjans F, Comhaire F. Deterioration of sperm qualities in young healthy Belgian men. *Hum. Reprod* 1996; 11 (2): 325-329.
5. Schuppe HC, Wieneke P, Donat S, Fritsche E, Köhn FM, Abel J. Xenobiotic metabolism, genetic polymorphisms and male infertility. *Andrología* 2000; 32 (4): 255-262.
6. Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum. Reprod* 2001; 16 (8): 1768-1776.
7. Wagner U, Schlebusch H, Van der Ven H, Van der Ven K, Diedrich K, Krebs D. Accumulation of pollutants in the genital tract of sterility patients. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 1990; 28 (10): 683-688.
8. Georgiadis P, Topinka J, Vlachodimitropoulos D, Stoikidou M, Gioka M, Stephanou G et al. Interactions between CYP1A1 polymorphisms and exposure to environmental tobacco smoke in the modulation of lymphocyte bulky DNA adducts and chromosomal aberrations. *Carcinogenesis* 2005; 26 (1): 93-101.
9. Dannan GA, Porubek DJ, Nelson SD, Waxman DJ, Guengerich PF. 17- β -Estradiol 2- and 4-Hydroxylation Catalyzed by Rat Hepatic Cytochrome P-450: Roles of Individual Forms, Inductive Effects, Developmental Patterns, and Alterations by Gonadectomy and Hormone Replacement. *Endocrinology* 1986; 118 (5): 1952-1960.
10. Spink DC, Spink BC, Cao JQ, De Pasquale JA, Pentecost BT, Fasco MJ et al. Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis* 1998; 19 (2): 291-298.
11. Tzamelis I, Pission P, Schuetz EG, Moore DD. The xenobiotic compound 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene is an agonist ligand for the nuclear receptor CAR. *Mol. Cell. Biol* 2000; 20 (9): 2951-2958.
12. Nerurkar P, Okinaka L, Aoki C, Seifried A, Lum-Jones A, Wilkens LR et al. CYP1A1, GSTM1, and GSTP1 Genetic Polymorphisms and Urinary 1-Hydroxypyrene Excretion in Non-Occupationally Exposed Individuals. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention* 2000; 9 (10): 1119-1122.
13. Lu N, Wu B, Xia Y, Wang W, Gu A, Liang J et al. Polymorphisms in CYP1A1 gene are associated with male infertility in a Chinese population. *Int. J. Androl* 2007; 31 (5): 527-533.
14. Fritsche E, Schuppe HC, Döhr O, Ruzicka T, Gleichmann E, Abel J. Increased frequencies of cytochrome P4501A1 polymorphisms in infertile men. *Andrología* 1998; 30 (3): 125-128.
15. Vani GT, Mukesh N, Prasad BS, Devi PR, Prasad MH, Rani PU et al. Association of CYP1A1*2A polymorphism with male infertility in Indian population. *Clin. Chim. Acta* 2009; 410 (1-2): 43-47.
16. Organización Mundial de la Salud (OMS). *Manual de laboratorios de la OMS para el examen de semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. 4ª ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2001.
17. Boyapati SM, Shu XO, Gao YT, Cai Q, Jin F, Zheng W. Polymorphisms in CYP1A1 and Breast Carcinoma Risk in a Population-Based Case-Control Study of Chinese Women. *Cancer* 2005; 103 (11): 2228-2235.
18. Gaspari L, Chang SS, Santella RM, Garte S, Pedotti P, Taioli E. Polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adducts in human sperm

- as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat. Res* 2003; 535 (2): 155-160.
19. Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P *et al.* Functional significance of different human *CYP1A1* genotypes. *Carcinogenesis* 1994; 15 (12): 2961-3.
 20. Moreno F, Moreno SM, Díaz CA, Bustos EA, Rodríguez JV. Prevalencia y variabilidad de ocho rasgos morfológicos dentales en jóvenes de tres colegios de Cali, 2002. *Colombia Médica* 2004; 35 (3) (Supl 1): 16-23.
 21. Salehi Z, Gholizadeh L, Vaziri H, Madani AH. Analysis of GSTM1, GSTT1, and CYP1A1 in idiopathic male infertility. *Reprod. Sci* 2012; 19 (1): 81-5.