

Variantes genéticas de CYP2A6 y su relación con la dependencia tabáquica y el hábito de fumar en una muestra individuos chilenos. Un estudio piloto

DANTE D. CÁCERES^{1,2,a}, SERGIO A. ALVARADO^{1,2,b},
PAULINA MARTÍNEZ^{4,3,a}, LUIS A. QUIÑONES^{4,c}

Relation of genetic variants of CYP2A6 with tobacco dependence and smoking habit in Chilean subjects. A pilot study

Background: Genetic and metabolic factors associated with nicotine metabolism may be related to smoking behavior. **Aim:** To assess the prevalence of allelic and genotype variants of CYP2A6 in a sample of Chilean subjects and to evaluate their relationship with smoking and tobacco dependence. **Material and Methods:** The genotype frequencies for *2, *3 and *4 of CYP2A6*1 (wild type) gene were determined by polymerase chain reaction (PCR) in 54 volunteers. Addiction to tobacco was evaluated using the Fagerström Test. The association between the presence of allelic variants of CYP2A6 and smoking and tobacco dependence was evaluated with chi square test. **Results:** The prevalence of *1, *2 (wt/*2), *3 (wt/*3 or *3/*3) and *4 (del/del) were 92.6%, 3.7%, 0% y 3.7%, respectively. No significant association was observed between being a carrier of a variant genotype of CYP2A6 and smoking or tobacco dependence. **Conclusions:** In this sample of Chilean individuals we did not find a relation between any CYP2A6 genotype with smoking or tobacco dependence.

(Rev Med Chile 2012; 140: 436-441).

Key words: CYP2A6; Genetic; Polymorphisms; Protein, human; Tobacco use disorder.

¹División de Epidemiología. Escuela de Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Santiago de Chile.

²Grups de Recerca d'America i Africa Llatines, Unitat de Bioestadística, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España.

³Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Diego Portales, Santiago de Chile.

⁴Centro de Investigaciones Farmacológicas y Toxicológicas. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile, Santiago de Chile.

^aMédico Veterinario, Magister en Salud Pública (MSP).

^bMatemático, Magister en Bioestadística (MB).

^cBioquímico, Doctor en Ciencias Biomédicas (PhD).

Trabajo financiado por Proyecto Departamento de Investigación y Desarrollo (DID-2000). Universidad de Chile.

Conflicto de Interés: Los autores de este manuscrito declaramos no tener conflictos de interés.

Recibido el 11 de mayo de 2011, aceptado el 30 de noviembre de 2011.

Correspondencia a:
Dante D. Cáceres Lillo
División de Epidemiología
Escuela de Salud Pública.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.
Independencia 939.
Código postal 8380453.
Santiago de Chile.
Teléfono: (562) 9786546;
Celular: 77597086
Fax: (562) 7377121
E-mail: dcaceres@med.uchile.cl

En la motivación para fumar tabaco y su dependencia influyen múltiples factores personales, sociales y ambientales, muchos de ellos ampliamente estudiados^{1,2}. Dentro de los personales se han identificado factores genéticos que dan cuenta de las variaciones en la mantención e intensidad de la adicción al tabaco^{3,4}. La genética contribuiría aproximadamente, en promedio, 55% (11-84) en la iniciación del hábito de fumar, en más de 61% promedio (52-71) en la mantención y en la cantidad fumada, y 80% en la variación en el número de cigarrillos fumados^{5,6}. Dentro de estos factores genéticos, las variantes alélicas de genes

que metabolizan la nicotina y predisponen al hábito de fumar, está siendo ampliamente estudiada y parecieran estar asociados tanto al inicio, como a la mantención y al número de cigarrillos fumados^{7,8}. Aun cuando la nicotina es uno de los miles de compuestos presentes en el humo del tabaco, no posee acción carcinogénica *per se*, sin embargo, su capacidad de ser altamente adictiva influye en el consumo de tabaco y por lo tanto, en la exposición continua a una serie de compuestos altamente tóxicos que producen una variada gama de efectos adversos en la salud. Los metabolizadores lentos de nicotina mantendrían los niveles de nicotina por

mayor tiempo en el organismo lo que se traduciría en un menor consumo de tabaco, reduciendo por ende la probabilidad de llegar a ser un fumador regular. Por el contrario, metabolizadores rápidos de nicotina, necesitarían fumar más a menudo para mantener sus niveles de nicotina sanguínea con la consecuencia que ello implica. En estudios con modelos econométricos realizados en Estados Unidos de Norteamérica, donde relacionaron el hábito actual y pasado de fumar, estimaron que alrededor de 60% de los fumadores pueden llegar a ser adictos, siendo esto altamente correlacionado con la precocidad del inicio del consumo⁹. Otros de los factores que explican los diferentes niveles del metabolito cotinina en personas con una similar tasa de consumo de tabaco incluyen diferencias en la absorción, distribución, profundidad y duración de la inhalación durante el consumo y la composición del tabaco usado en la fabricación de cigarrillos¹⁰.

Diferentes estudios de ligamiento genético y de asociación han identificado zonas y genes donde se podrían alojar la dependencia a nicotina. Entre los primeros, estudios en gemelos y padres de gemelos, han reportado relación con la dependencia en áreas del cromosoma 1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11 y 22, indicando la multiplicidad de locus genéticos que estarían implicados, lo que habla de la heterogeneidad de este rasgo y del tipo de penetrancia genética. Por otra parte, los estudios de asociación genética a nivel de polimorfismos de receptores del sistema dopaminérgico, están involucrados en esta dependencia, los que están interactuando con los factores ambientales¹¹. Entre estos factores metabólicos, la isoenzima CYP2A6 (perteneciente al grupo de las denominadas monooxigenasas citocromo P450) ha sido sindicada como la más relacionada al hábito de fumar¹²⁻¹⁷. La asociación entre CYP2A6 y tabaco-dependencia se establece debido al rol de esta enzima en el metabolismo de nicotina, la cual es transformada a cotinina. Esta metabolización ayuda a la inducción de la adicción, ya que cuando la actividad de esta enzima se encuentra disminuida o ausente, al parecer los individuos tienden a ser no fumadores o pocos fumadores. El estudio pionero de Pianezza y sus colaboradores demuestra en forma muy clara que las personas que presentan polimorfismos o deleciones en el gen CYP2A6 tendrían menor tendencia a ser fumadoras¹⁷. En la actualidad existen una serie de criterios para evaluar el grado de dependencia a nicotina, siendo uno de los más

usados la escala de Fagerström (*FTND: Fagerström Test for Nicotine Dependencia*) especialmente útil en fumadores dependientes, lo que nos permite correlacionar las variantes genotípicas asociadas a mayor consumo de cigarrillos y a una probable adicción¹⁸.

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de los genotipos de los polimorfismos *1 (*wild type*), *2, *3 y *4 de CYP2A6 en una muestra de la población chilena y evaluar su asociación con el hábito de fumar y la dependencia al tabaco.

Material y Método

Individuos

Un total de 54 estudiantes universitarios voluntarios fumadores y no fumadores de la carrera de Medicina de la Universidad de Chile fueron reclutados para el estudio. Previa consulta de su hábito de fumar, se tomó una muestra por cuotas de voluntarios al interior de los fumadores y una muestra al interior del grupo de no fumadores, respectivamente. Como se desconocía la prevalencia de los polimorfismos estudiados y siendo muy baja, según la literatura, se evaluó a través de un estudio piloto. Cada voluntario llenó una ficha con información sobre: historial clínico, antecedentes familiares respecto de cáncer, parámetros socioeconómicos, hábitos alimentarios, consumo de fármacos, alcohol y su historia de hábito tabáquico. Aquellos que reportaron ser fumadores fueron clasificados con el cuestionario de Fagerström para evaluar la dependencia al consumo de cigarrillos¹⁸. Cada persona firmó una autorización de consentimiento informado, previamente aprobada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Los procedimientos empleados se realizaron respetando la declaración de Helsinki para la experimentación en humanos y de acuerdo a las normas de trabajo de las Buenas Prácticas Clínicas (GCP)^{19,20}.

Toma de muestra de sangre, obtención de ADN y genotipificación de CYP2A6

Se extrajo a cada donante voluntario una muestra de aproximadamente 15 ml de sangre en condiciones estériles, con un sistema de extracción al vacío, considerando todas las medidas de bioseguridad necesarias para evitar riesgos tanto para el donante como para la persona que tomó la mues-

Tabla 1. Características antropométricas, antecedentes del hábito de fumar, nivel de adicción según el cuestionario de Fagerström de una muestra de 54 individuos chilenos

| Características antropométricas | | | |
|---|----------|------------|---------|
| Sexo: femenino, n (%) | 37 | (68,5) | |
| Edad: promedio, (DE), (Min-Max) | 21,9 | (2,9) | (19-36) |
| Hábito de Fumar | | | |
| Fuman: n (%) | 23 | (42,6) | |
| Años fumando: promedio, (DE), (Min-Max) | 4,4 | (2,5) | (1-12) |
| Nº de cigarrillos/día: promedio, (DE), (Min-Max) | 6,4 | (5,3) | (1-20) |
| Antecedentes familiares de hábito de fumar | | | |
| | n | (%) | |
| Padre fumador, n (%) | 18 | (33,9) | |
| Madre fumadora, n (%) | 23 | (42,3) | |
| Hermanos, n (%) | 20 | (36,5) | |
| Abuelos, n (%) | 5 | (9,0) | |
| Puntaje cuestionario de Fagerström | | | |
| | n | (%) | |
| 4 puntos | 9 | (42,9) | |
| 5 puntos | 4 | (19,0) | |
| 6 puntos | 8 | (38,1) | |

n: número; DE: Desviación Estándar; Min: mínimo; Max: máximo.

tra. La obtención de ADN se hizo por el método basado en la precipitación por sales (*salting-out*), descrito por Miller y col 1988, el cual permite obtenerlo en forma simple, rápida, reproducible y con una pureza adecuada para realizar amplificaciones por PCR²¹. La genotipificación de las variantes polimórficas de CYP2A6 se realizó a través de la metodología de PCR según Oscarson y col²². La reacción se realizó esencialmente en dos pasos. El primer paso correspondió a una amplificación de una región desde el exón 7 hasta 420 pb río abajo del exón 9, y el segundo a una amplificación usando como templado el amplificado anterior, para la detección de los diferentes genotipos. Como control interno de amplificación se usó el gen de la β -globina, para lo cual se amplificó simultáneamente. Las variantes estudiadas fueron CYP2A6*1, *2, *3 que ocurren debido a mutaciones puntuales en la región que comprende el intrón 2, exón 3 e intrón 4 del gen y la variante CYP2A6*4 que corresponden a deleciones homocigotas en el exón 3 y 8, respectivamente.

Resultados

En la Tabla 1 se presentan las características demográficas y sobre el consumo de tabaco personal y familiar de la muestra en estudio. El 68,5% fueron mujeres. El promedio de edad del grupo en

estudio fue de 21,9 años. En cuanto al hábito de fumar, 42,6% eran fumadores, los cuales llevaban en promedio 4,4 años fumando, con promedio de 6,4 cigarrillos diarios. En cuanto a los antecedentes familiares sobre el hábito de fumar, los rangos variaron entre 33,9% y 42,3%. El mayor porcentaje de los individuos estudiados pertenecía al grupo sanguíneo O (46,3%) y el que le sigue en frecuencia fue el grupo sanguíneo A (35,2%). Los resultados del test de Fagerström aplicado al grupo de fumadores categorizan al 57,1% de los individuos fumadores como “*más adictos a nicotina*”, es decir, con un puntaje mayor o igual 5 puntos.

En la Tabla 2 se presenta la frecuencia de las variantes genotípicas de CYP2A6, estratificada por hábito de fumar y clasificación del grado de adicción a la nicotina. Se puede observar que el mayor porcentaje (92,6%) corresponde a la variante normal *wild type*. Las variantes *2, *3, *4 presentaron una frecuencia de 3,7%, 0%, 3,7%, respectivamente. Al estratificar según el hábito de fumar, la distribución de la variante *wild type* *1 y *3 fue similar. La variante *2 y *4 variaron porcentualmente, sin embargo, esta diferencia no fue significativa. No se observó asociación entre las variantes y el hábito de fumar ($p = 0,132$). Al clasificar el grupo de fumadores según la adicción al tabaco, la variante *wild type* estuvo en 90,5% de los fumadores. Al estratificar según adicción 92,3% de los “*más adictos*” son portadores de la variante

Tabla 2. Frecuencia de las variantes genotípicas de CYP2A6 estratificado por el hábito de fumar y clasificación del grado de adicción de una muestra de 54 individuos chilenos

| Según hábito de fumar | Fumadores | | No fumadores | | Total | |
|---------------------------------|-------------|--------|---------------|--------|-------|--------|
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) |
| CYP2A6*1 (wild type) | 27 | (93,1) | 23 | (92,0) | 50 | (92,6) |
| CYP2A6 wt/*2 | 0 | (0,0) | 2 | (8,0) | 2 | (3,7) |
| CYP2A6 wt/*3 o *3/*3 | 0 | (0,0) | 0 | (0,0) | 0 | (0,0) |
| CYP2A6*4 (del/del) | 2 | (6,9) | 0 | (0,0) | 2 | (3,7) |
| $\chi^2 = 4,05$ p-value = 0,132 | | | | | | |
| Según adicción† | Más adictos | | Menos adictos | | Total | |
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) |
| CYP2A6*1 (wild type) | 12 | 92,3 | 7 | 87,5 | 19 | (90,5) |
| CYP2A6 wt/*2 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | (0,0) |
| CYP2A6*3 wt/*3 o *3/*3 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | (0,0) |
| CYP2A6*4 (del/del) | 1 | 7,7 | 1 | 12,5 | 2 | (9,5) |
| $\chi^2 = 0,13$ p-value = 0,716 | | | | | | |

†Test de Fagerström.

wild type, comparado con 87,5% de los clasificados como “*menos adictos*”. Las variantes *2 y *3 no fueron determinadas en este grupo. La variante *4 estuvo presente en 7,7% de los “*más adictos*” versus 12,5% de los “*menos adictos*”. Tampoco se observó asociación estadística entre el grado de adicción y los diferentes genotipos ($p = 0,716$).

Discusión

Chile tiene una de las más altas prevalencias de hábito tabáquico en América Latina y a nivel mundial (45,4%) alcanzando hombres y mujeres similar magnitud²³. En Chile se estima que cada año mueren 15.000 personas a causa del tabaco, cifra que representa el 17% de la mortalidad total del país²⁴. Según Medina y col (1995), se ha reportado que no han ocurrido hechos capaces de modificar la prevalencia poblacional de fumadores y que no se explica por otros determinantes sociales como nivel socioeconómico y cultural de la familia. Valdivia y col (2004) en un estudio de prevalencia de consumo de tabaco en población menor a 18 años en Chile, se menciona que 64,1% de los escolares declaró haber tomado contacto directo con el cigarrillo en algún momento de su vida, lo que fue independiente del nivel socioeconómico y de la zona geográfica de habitación. Los autores afirman, que este fenómeno viene dándose sistemáticamente en los estudios nacionales realizados²⁵.

Se ha descrito extensivamente que la variabilidad genética en el metabolismo de la nicotina es un factor importante que explicaría las diferencias interindividuales en el consumo y exposición al tabaco (polimorfismos genéticos), que darían cuenta de estas variaciones individuales^{11,26}. El presente estudio tuvo como objetivo determinar la frecuencia de las variantes polimórficas CYP2A6*1, CYP2A6*2, CYP2A6*3, CYP2A6*4 del Gen CYP2A6 y explorar su relación con el hábito tabáquico y la intensidad de consumo de cigarrillos. Las variantes alélicas *2 y *3 han sido descritas con actividad enzimática reducida y *4 sin actividad *in vivo*^{7,27}. Las prevalencias determinadas en este estudio fueron similares a la reportadas en poblaciones de origen hispano, cuyas frecuencias genotípicas para CYP2A6*1 y CYP2A6wt/*2 varían entre 97% y 3% respectivamente²⁸.

Al evaluar la asociación entre las variantes polimórficas determinadas con el hábito de fumar y la intensidad de consumo de cigarrillos (cigarrillos diarios fumados), no se observó relación entre el hábito de fumar ni la intensidad con el ser portador de una determinada variante alélica. Diversos estudios han reportado hallazgos similares en cuanto a la relación estudiada. London y col (1999) estudiaron 460 individuos en un estudio de casos y controles en el condado de Los Ángeles California, en el cual evaluaron las variantes polimórficas de reducida actividad metabólica CYP2A6*2 y

CYP2A6*3 no encontrando diferencias en cuanto a la cantidad de cigarrillos fumados²⁹. Sabol estudió 385 individuos de diferente origen étnico no encontrando asociación entre el genotipo, ser fumador y consumidor de cigarrillos. A pesar de que analizó población de origen hispano latina, no se presentan los resultados estratificados por etnia³⁰. Lorient y cols, en 494 individuos de origen francés en un estudio de casos y controles de cáncer pulmonar, tampoco encontró relación entre las variantes estudiadas (CYP2A6*2 y CYP2A6*4) con el consumo de cigarrillos y el cáncer de pulmón³¹. Tiihonen, en un estudio de base poblacional (n = 965) realizado en población finlandesa, no encontró relación entre ser fumador y el número de cigarrillos fumados entre individuos portadores del gen *wild type* versus aquellos que presentaban genotipos nulos³². Gambier y col estudiaron la frecuencia alélicas de las variantes CYP2A6*1A, CYP2A6*1B y CYP2A6*4 en relación al estatus de fumador y el número de cigarrillos fumados. Estos autores reportan que no hubo diferencias en cuanto al estatus de fumador, sin embargo, si hubo diferencias entre el *wild type* y CYP2A6*1B en cuanto a los cigarrillos fumados diariamente, siendo la cantidad fumada mayor en esta última variante³³.

De acuerdo a la literatura, cabría esperar que aquellos individuos que tienen un alto grado de dependencia presenten una baja frecuencia de los polimorfismos genéticos de la enzima CYP2A6 y sea mucho más frecuente la variante *wild type*. En este estudio la frecuencia de las variantes polimórficas estudiadas se ajustan a lo reportado para la etnia de origen hispánico, sin embargo, no se observó asociación cuantitativa ni cualitativa con el número de cigarrillos fumados y el hábito de fumar, respectivamente.

Dentro de las limitaciones de este estudio, está el tamaño de muestra. Dado que la prevalencia de la variable de interés “la variante polimórfica del gen CYP2A6: *2” es cercana al 1% en la población (basado en la literatura de estudios internacionales), se decidió aplicar muestreo por cuota, donde el número de sujetos que se puede alcanzar está relacionado con los recursos y logística disponible. Para hacer estudios de comparabilidad con una adecuada potencia estadística, se requieren tamaños de muestra significativamente mayores y que estarán asociados a los supuestos e hipótesis en estudio. Por lo tanto, es necesario estudiar un

mayor grupo de individuos para evaluar la consistencia de estos hallazgos.

Agradecimientos: Los autores desean agradecer el apoyo técnico brindado por las estudiantes de Medicina Karen García y Loreto Godoy, quienes realizaron parte de los estudios de este trabajo durante una estadía de investigación de pregrado.

Referencias

1. Nebot M, Puig R, Ballestin M, Albericci M. [Tobacco in Barcelona's metropolitan transportation: observation study]. *Aten Primaria* 2001; 28 (1): 50-2.
2. Bleger J. *Psicología de la Conducta*. 1998.
3. Walton R, Johnstone E, Munafo M, Neville M, Griffiths S. Genetic clues to the molecular basis of tobacco addiction and progress towards personalized therapy. *Trends Mol Med* 2001; 7 (2): 70-6.
4. Munafo M, Johnstone E, Murphy M, Walton R. New directions in the genetic mechanisms underlying nicotine addiction. *Addict Biol* 2001; 6 (2): 109-17.
5. Hamdani N, Ades J, Gorwood P. [Heritability and candidate genes in tobacco use]. *Encephale* 2006; 32 (6 Pt 1): 966-75.
6. Madden PA, Heath AC, Pedersen NL, Kaprio J, Koskenvuo MJ, Martin NG. The genetics of smoking persistence in men and women: a multicultural study. *Behav Genet* 1999; 29 (6): 423-31.
7. Nakajima M, Yokoi T. Interindividual variability in nicotine metabolism: C-oxidation and glucuronidation. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20 (4): 227-35.
8. Hukkanen J, Jacob P, 3rd, Benowitz NL. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 2005; 57 (1): 79-115.
9. Céspedes-Lantigua L, Lorenzo Rodríguez A, Castañer-Herrera J, Pérez-Coronel P. Consideraciones y papel del médico de familia en la desestimulación del hábito de fumar. *Rev Cubana Med Gen Integr* 2001; 17 (6): 606-10.
10. Fernández-Salguero P, Hoffman SM, Cholerton S, Mohrenweiser H, Raunio H, Rautio A, et al. A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles. *Am J Hum Genet* 1995; 57 (3): 651-60.
11. Lessov-Schlaggar CN, Pergadia ML, Khroyan TV, Swan GE. Genetics of nicotine dependence and pharmacotherapy. *Biochem Pharmacol* 2008; 75 (1): 178-95.
12. Inoue K, Yamazaki H, Shimada T. CYP2A6 genetic polymorphisms and liver microsomal coumarin and

- nicotine oxidation activities in Japanese and Caucasians. *Arch Toxicol* 2000; 73 (10-11): 532-9.
13. Nakajima M, Yamagishi S, Yamamoto H, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Yokoi T. Deficient cotinine formation from nicotine is attributed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67 (1): 57-69.
 14. Kitagawa K, Kunugita N, Katoh T, Yang M, Kawamoto T. The significance of the homozygous CYP2A6 deletion on nicotine metabolism: a new genotyping method of CYP2A6 using a single PCR-RFLP. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262 (1): 146-51.
 15. Murphy SE, Johnson LM, Pullo DA. Characterization of multiple products of cytochrome P450 2A6-catalyzed cotinine metabolism. *Chem Res Toxicol* 1999; 12 (7): 639-45.
 16. Idle JR. CYP2A6 polymorphism, nicotine, and environmental nitrosamines. *Lancet* 1999; 353 (9169): 2073.
 17. Pianezza ML, Sellers EM, Tyndale RF. Nicotine metabolism defect reduces smoking. *Nature* 1998; 393 (6687): 750.
 18. Heatherton TF, Kozlowski LT, Frecker RC, Fagerstrom KO. The Fagerstrom Test for Nicotine Dependence: a revision of the Fagerstrom Tolerance Questionnaire. *Br J Addict* 1991; 86 (9): 1119-27.
 19. Mamdani B. The Helsinki Declaration, 2000, and ethics of human research in developing countries. *Indian J Med Ethics* 2004; 1 (3): 94-5.
 20. ICH harmonised tripartite guideline: guideline for good clinical practice. 8. Essential documents for the conduct of a clinical trial. *J Postgrad Med* 2001; 47 (4): 264-7.
 21. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16 (3): 1215.
 22. Oscarson M, McLellan RA, Gullsten H, Agundez JA, Benitez J, Rautio A, et al. Identification and characterisation of novel polymorphisms in the CYP2A locus: implications for nicotine metabolism. *FEBS Lett* 1999; 460 (2): 321-7.
 23. Champagne BM, Sebrerie EM, Schargrodsky H, Pramparo P, Boissonnet C, Wilson E. Tobacco smoking in seven Latin American cities: the CARMELA study. *Tob Control* 2010; 19 (6): 457-62.
 24. MINSAL. Situación del Tabaco en Chile. 2011 [citado 20 octubre de 2011]; Available from: http://www.minsal.gob.cl/portal/url/page/minsalcl/g_proteccion/g_tabaco/situacionenchile.html
 25. Valdivia G, Simonetti F, Cumsille P, Ramírez V, Hidalgo CG, Palma B, et al. [Smoking habit in school age children, in Chile]. *Rev Med Chile* 2004; 132 (2): 171-82.
 26. Strasser AA, Malaiyandi V, Hoffmann E, Tyndale RF, Lerman C. An association of CYP2A6 genotype and smoking topography. *Nicotine Tob Res* 2007; 9 (4): 511-8.
 27. Malaiyandi V, Sellers EM, Tyndale RF. Implications of CYP2A6 genetic variation for smoking behaviors and nicotine dependence. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77 (3): 145-58.
 28. Oscarson M, Gullsten H, Rautio A, Bernal ML, Sinus B, Dahl ML, et al. Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *FEBS Lett* 1998; 438 (3): 201-5.
 29. London SJ, Idle JR, Daly AK, Coetzee GA. Genetic variation of CYP2A6, smoking, and risk of cancer. *Lancet* 1999; 353 (9156): 898-9.
 30. Sabol SZ, Hamer DH. An improved assay shows no association between the CYP2A6 gene and cigarette smoking behavior. *Behav Genet* 1999; 29 (4): 257-61.
 31. Lorient MA, Rebuissou S, Oscarson M, Cenee S, Miyamoto M, Ariyoshi N, et al. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2A6 in a case-control study on lung cancer in a French population. *Pharmacogenetics* 2001; 11 (1): 39-44.
 32. Tiihonen J, Pesonen U, Kauhanen J, Koulu M, Hallikainen T, Leskinen L, et al. CYP2A6 genotype and smoking. *Mol Psychiatry* 2000; 5 (4): 347-8.
 33. Gambier N, Batt AM, Marie B, Pfister M, Siest G, Visvikis-Siest S. Association of CYP2A6*1B genetic variant with the amount of smoking in French adults from the Stanislas cohort. *Pharmacogenomics J* 2005; 5 (4): 271-5.