



LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
y la Facultad de Ciencias Químicas  
*en el marco del*



*Otorgan la presente:*

# CONSTANCIA

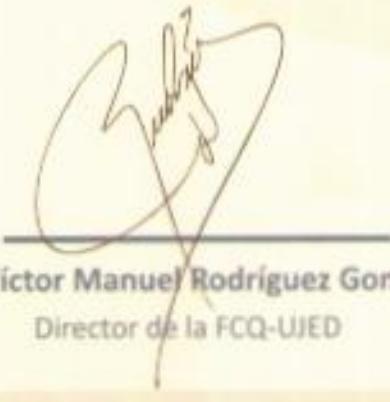
**A: ESPERANZA YASMIN CALLEROS RINCON**

*Por su valiosa participación como ASISTENTE al:*

**"9º SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS,  
EDICIÓN 2015"**

*Efectuado del 19 al 23 de Octubre del 2015*

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Gómez Palacio, Dgo., a 23 de Octubre de 2015**

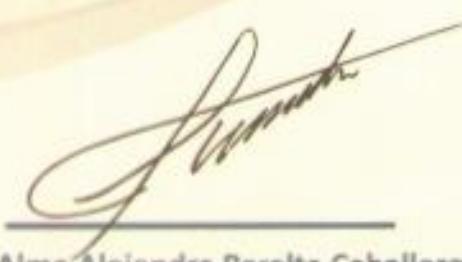


Dr. Víctor Manuel Rodríguez González  
Director de la FCQ-UJED



DIRECCIÓN

I.Q.A. Alma Alejandra Peralta Caballero  
Secretaria Académica FCQ-UJED





Universidad Juárez del Estado de Durango  
Facultad de Ciencias Químicas  
Gómez Palacio



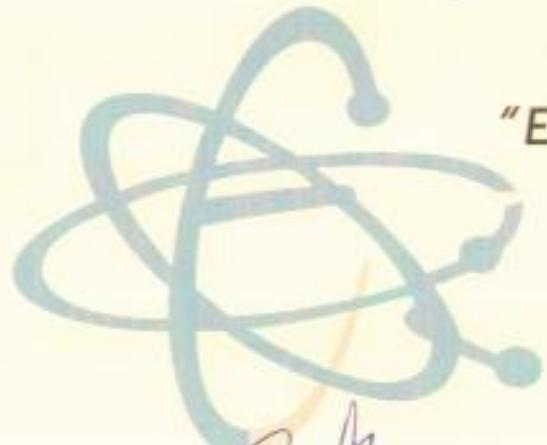
Otorga la presente

## CONSTANCIA

A: *Esperanza Yazmín Calleros Rincón*

Por su participación como **ASISTENTE** al curso:

**"EVALUACIÓN POR COMPETENCIAS"**



Efectuado del 15 al 18 de junio de 2015.

Con una duración de 20 horas.

**"Por mi Raza Hablará el Espíritu"**

Gómez Palacio, Dgo. A/04 de septiembre de 2015.

Dr. Víctor Manuel Rodríguez González  
Director FCQ-UJED

I.Q.A. Alma Alejandra Peralta Caballero  
Secretaria Académica

Dr. Carlos Alejandro Zarzar Charur  
Ponente



LA SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN MEDIA SUPERIOR DE LA SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

Y

LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

otorgan el presente

**D I P L O M A**

AL (A) C.

**ESPERANZA YAZMIN CALLEROS RINCÓN**

Por haber cursado y aprobado el "**DIPLOMADO EN FORMACIÓN DE TUTORES PARA EL ACOMPAÑAMIENTO DE JÓVENES EN RIESGO DE ABANDONO ESCOLAR**" en planteles de la Universidad Juárez del Estado de Durango con una duración de 240 horas, realizado de Noviembre del 2014 a Junio de 2015.



**Mtro. Oscar Erasmo Navar García**  
Rector de la Universidad Juárez del  
Estado de Durango

Victoria de Durango , Dgo., 5 de Junio de 2015

**Ing. Lauro Cordero Frayre**

Representante de la Subsecretaría de Educación Media  
Superior en el Estado de Durango



LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
y la Facultad de Ciencias Químicas  
*en el marco del*



Otorgan la presente:

# CONSTANCIA

A la: *Dra. Esperanza Yazmín Calleros Rincón*

Por su valiosa participación como ASISTENTE al curso:

## **"Importancia del diagnóstico molecular de la fragmentación del ADN y sus implicaciones clínicas"**

Efectuado del 19 al 23 de Octubre del 2015, con una duración de 20 horas.

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Gómez Palacio, Dgo., a 23 de Octubre de 2015



DIRECCIÓN

Dr. Víctor Manuel Rodríguez González  
Director de la FCQ-UJED



Dr. Javier Morán Martínez  
Instructor



I.Q.A. Alma Alejandra Peralta Caballero  
Secretaria Académica FCQ-UJED



XIV International  
Congress of  
**Toxicology**

In conjunction with the  
**X Mexican Congress of  
Toxicology**

Merida, Mexico. October 2-6, 2016

We certify that

## Esperanza Yasmin Calleros Rincon

has attended the XIV International Congress of Toxicology in conjunction with  
the X Mexican Congress of Toxicology held in Merida, Mexico.

Merida, October 2-6, 2016

Betzabet Quintanilla Vega PhD  
Congress President

Ma. Concepción Gutiérrez-Ruiz PhD  
SoMTox President



SOCIEDAD MEXICANA  
DE TOXICOLOGÍA AC  
smtox.com.mx

**iutox**  
INTERNATIONAL UNION OF TOXICOLOGY



UJED

UNIVERSIDAD JUÁREZ  
DEL ESTADO DE DURANGO

10º SIMPOSIUM INTERNACIONAL  
DE CIENCIAS QUÍMICAS 2016  
**SICQ**  
Ciencia, Ingeniería y Salud



# CONSTANCIA

A: CALLEROS RINCÓN ESPERANZA YAZMÍN

Por su valiosa participación como **ASISTENTE** al:

**"10º Simposium Internacional de Ciencias Químicas, edición 2016"**

Efectuado del 17 al 21 de Octubre del 2016

**"POR MI RAZA HABLA EL ESPÍRITU"**

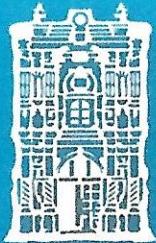
Gómez Palacio, Dgo., a 21 de octubre del 2016



DIRECCIÓN

Dr. Víctor Manuel Rodríguez González  
Diseño FCQ-UJED

M.C. Alba Alejandra Peralta Caballero  
Secretaria Académica FCQ-UJED



UJED

UNIVERSIDAD JUÁREZ  
DEL ESTADO DE DURANGO



11º SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS



# CONSTANCIA

*A los autores:*

**Castillo Vázquez Carlos, Nieto Rodríguez Alejandro, De la Cruz  
Morales Eugenia, Calleros Rincón Esperanza, Pérez Morales Rebeca  
Olivas Calderón Edgar**

Por su valiosa participación en la exposición del cartel:  
*identificación de errores de medicación más comunes en niños hospitalizados en un instituto  
de alta especialidad en la Ciudad de México*

Dr. Víctor Manuel Rodríguez González  
Director FCQ-UJED

**“11º Simposium Internacional de Ciencias Químicas”**

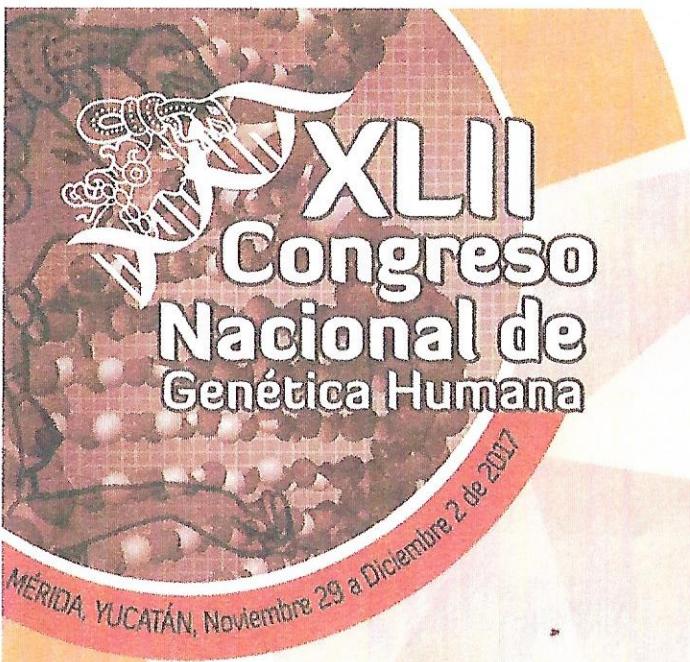
Gómez Palacio, Dgo. 16 al 20 de Octubre de 2017

**“POR MI RAZÓN HABRÁ EL ESPÍRITU”**



DIRECCIÓN

M.C. Alma Alejandra Peralta Caballero  
Secretaria Académica FCQ-UJED



# La Asociación Mexicana de Genética Humana

otorga la presente Constancia a:



Pérez Morales Rebeca, Gandarilla Esparza Diana Dennys, González Zamora Alberto, Calleros Rincón Esperanza Y

Por la presentación del trabajo libre en modalidad Oral:

**ALTERACIÓN EN NIVELES DE HORMONAS TIROIDEOS POR LA  
PRESENCIA DE POLIMORFISMOS rs965513 y rs1867277 DEL GEN FOXE1**

Mérida, Yucatán, diciembre 1 de 2017

DR. JORGE E. ZAVALA CASTRO  
Director CIR Dr. Hideyo Noguchi UADY

DRA. DORIS PINTO ESCALANTE  
Presidente AMGH

DR. RODRIGO RUBÍ CASTELLÁN  
Secretario AMGH



El Gobierno del Estado de Durango a través de la  
Secretaría de Salud otorga la presente

# Constancia

A:

Calleros Rincón Esperanza Yasmin, Pérez Morales Rebeca,  
Gandarilla Esparza Diana Dennys, Olivas Calderón Edgar Héctor,  
Avalos Calleros Bertha Yasmin.

Por su participación con el trabajo:

**IMPACTO DE LOS NITRATOS EN LA REPRODUCCIÓN FEMENINA**  
en el marco de la I Jornada Nacional de Investigación en Salud Durango 2017

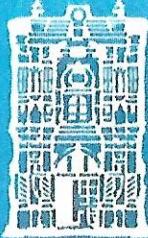
**José Rosas Aispuro Torres**

Gobernador del Estado de Durango

**Dr. César Humberto Franco Mariscal**

Secretario de Salud y Dir. Gral. de los Servicios de Salud

Victoria de Durango, Dgo. a Agosto de 2017



UJED

UNIVERSIDAD JUÁREZ  
DEL ESTADO DE DURANGO



11º SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS

# CONSTANCIA

*A los autores:*

**De la Cruz Morales Eugenia, Araujo López Déborah,  
Castillo Vázquez Carlos, Calleros Rincón Esperanza, Pérez  
Morales Rebeca, Olivas Calderón Edgar**

Por su valiosa participación en la exposición del cartel:

*Interacciones medicamentosas más frecuentes en el servicio de trasplante  
de médula ósea de un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México.*

en el marco del

**"11º Simposium Internacional de Ciencias Químicas"**

Gómez Palacio, Dgo. 16 al 20 de Octubre de 2017

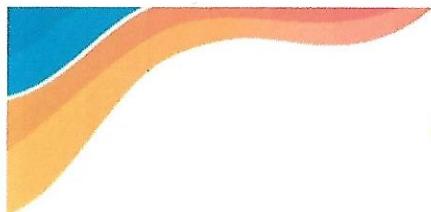
DIRECCIÓN

Dr. Víctor Manuel Rodríguez González  
Director FCQ-UJED



*"POR MIRARÁ HABLARÁ EL ESPÍRITU"*

M.C. Alma Alejandra Peralta Caballero  
Secretaria Académica FCQ-UJED



**El Gobierno del Estado de Durango a través de la  
Secretaría de Salud otorga la presente**

# *Constancia*

A:

**Rebeca Pérez Morales, María Fernanda González Delgado,  
Alberto González Zamora, Esperanza Y. Calleros Rincón E, Edgar H. Olivas  
Calderón, Ollin Celeste Martínez-Ramírez, Julieta Rubio.**

Por su participación con el trabajo:

**VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS RECEPTORES CHRNA3 (RS1051730) Y CHRNA5 (RS16969968),  
SU IMPLICACIÓN EN LA DEPENDENCIA A LA NICOTINA Y SU ASOCIACIÓN CON CANCER  
PULMONAR Y EPOC.**

En el marco de la I Jornada Nacional de Investigación en Salud Durango 2017

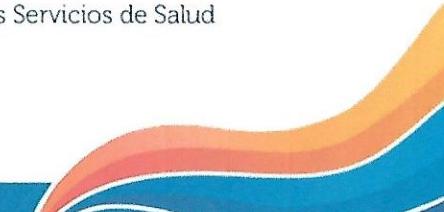
**José Rosas Aispuro Torres**

Gobernador del Estado de Durango

**Dr. César Humberto Franco Mariscal**

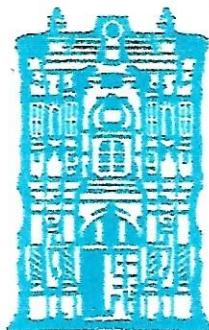
Secretario de Salud y Dir. Gral. de los Servicios de Salud

Victoria de Durango, Dgo. a Agosto de 2017



# LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS GÓMEZ PALACIO

en el marco



Otorgan la presente:

## CONSTANCIA

A: López Domínguez Monserrat, Avalos Calleros Bertha Yasmin, Olivas Calderón Edgar Héctor, Pérez Morales Rebeca, Alba Romero José de Jesús, González Zamora Alberto, Calleros Rincón Esperanza Yasmin

Por su valiosa participación como **PONENTES DEL CARTEL :**

**ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LA CÉLULA ESPERMÁTICA EN ESTUDIANTES CON TABAQUISMO POSITIVO**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Gómez Palacio, Dgo., a 08 de Octubre de 2018

Dr. Juan José Martínez García

Director de la FCQ-UJED



DIVISIÓN DE  
ESTUDIOS DE  
POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

Dra. Concepción García Luján

Jefa de la División de Estudios de  
Posgrado e Investigación

## ALTERACIONES MORFOLÓGICAS DE LA CÉLULA ESPERMÁTICA EN ESTUDIANTES CON TABAQUISMO POSITIVO

<sup>1</sup>López Domínguez Monserrat, <sup>2</sup>Avalos Calleros Bertha Yasmin, <sup>1</sup>Olivas Calderón Edgar Héctor,

<sup>1</sup>Pérez Morales Rebeca, <sup>1</sup>Alba Romero José de Jesús, <sup>3</sup>González Zamora Alberto.,

<sup>1</sup>\*Calleros Rincón Esperanza Yasmin.

<sup>1</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Campus Gómez Palacio. Artículo 123 s/n, Colonia Filadelfia, 35015, Gómez Palacio, Durango. <sup>2</sup>Universidad Vizcaya de las Américas. Boulevard Venustiano Carranza Núm 4925 Esq. con Boulevard Nazario Ortiz Garza, Saltillo, Coah.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas Gómez Palacio de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, C.P. 35010, Gómez Palacio, Dgo., México

\* Email: peracalleros@gmail.com

**Introducción:** El tabaquismo es un hábito prevalente en el estilo de vida de jóvenes, que induce al estrés oxidativo, incrementando los niveles de oxidantes procedentes del humo, y disminuyendo los niveles de antioxidantes en el plasma seminal. El humo del tabaco contiene más de 4000 tipos de componentes. Estas sustancias peligrosas y dañinas tienen propiedades antigénicas, citotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, que podrían tener resultados desfavorables en la reproducción masculina. La concentración, motilidad y morfología son parámetros comúnmente utilizados para determinar el potencial de fertilización de un eyaculado. Estos parámetros dan una visión general de la calidad de los espermatozoides.

**Objetivo:** Conocer el efecto que tiene el consumo de tabaco en la morfología de la célula espermática en la población de jóvenes estudiantes con tabaquismo positivo.

**Material y métodos:** El presente trabajo se realizó en el laboratorio de posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas fueron analizadas 30 muestras de semen, esto por medio de observación directa al microscopio. Todos ellos de 18 a 23 años, se les aplicó un cuestionario previo para obtener información de su historial clínico, salud general, hábitos y lugares de procedencia entre otros datos, así como la firma de consentimiento informado.

**Resultados:** El promedio de cigarros por día fue de 5, durante 3 años, presentando alteraciones en la morfología, macrocéfalo: 90%, microcéfalo, piriforme, bicéfalos 43%, amorfo: 50%, Alfiler: 63%, redondo 83%.

**Conclusión:** Los resultados preliminares demuestran la presencia de alteraciones en la morfología de la célula espermática de los estudiantes con tabaquismo positivo.

**Palabras clave:** Tabaquismo, célula espermática, morfología.



Federación Nacional de Químicos Clínicos, CONAQUIC A.C.

afiliado a la

DGP F-370

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

y

el Colegio de Químicos de Tabasco A.C.



Otorgan el presente

# Reconocimiento

a

**Dr. José de Jesús Alba Romero, Esperanza Yazmín Calleros Ricón,  
Sandra Isabel Hernández González, José Luis Ortega Sánchez y Aurora Martínez Romero.**

por su participación en el concurso de trabajos libres, con el tema:

**Aislamiento e identificación fenotípica e inmunológica del género Brucella sp en quesos fresco  
de La Comarca Lagunera de Durango.**

En el marco del XLII Congreso Nacional de Químicos Clínicos y Expoquím, Tabasco 2018.

Realizado del 13 al 15 de septiembre del 2018.

Llave digital: NDM=VEw=NDE=5

Villahermosa Tabasco a 15 de septiembre del 2018.

Quím. David Gámez Córdova  
Secretario de Educación Continua

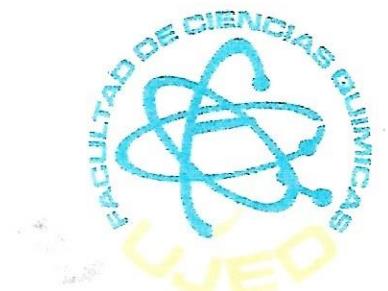
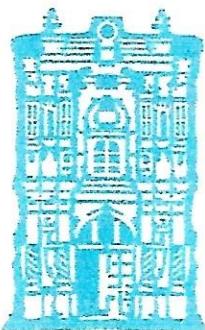
M en C. Alejandra Anilben Cano Huizar  
Presidente CONAQUIC, A.C.



Quím. Elizabeth Karam Romano  
Presidente Del Colegio de Químicos de Tabas

# LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS GÓMEZ PALACIO

en el marco



Otorgan la presente:

## CONSTANCIA

A: Medina-García A, Peñaloza-Castillo E, García-Vargas GG, Duarte-Sustaita J, Llanas-Wong JM, Facio-Campos RA, Moran-Martínez J, Calleros-Rincón EY, Perez-Morales R, Olivas-Calderón E

Por su valiosa participación como **PONENTES DEL CARTEL**:

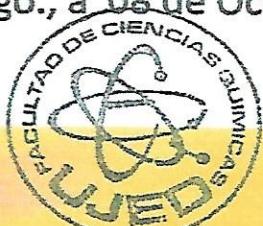
**.CONCENTRACIÓN DE FLÚOR URINARIO EN MADRES Y NEONATOS RESIDENTES DE LA COMARCA LAGUNERA DE DURANGO.**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Gómez Palacio, Dgo., a 08 de Octubre de 2018

Dr. Juan José Martínez García

Director de la FCQ-UJED



DIVISIÓN DE  
ESTUDIOS DE  
POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

Dra. Concepción García Luján

Jefa de la División de Estudios de  
Posgrado e Investigación

## CONCENTRACIÓN DE FLÚOR URINARIO EN MADRES Y NEONATOS RESIDENTES DE LA COMARCA LAGUNERA DE DURANGO.

<sup>1</sup>Medina-García A, <sup>2</sup>Peñaloza-Castillo E, <sup>3</sup>García-Vargas GG, <sup>3</sup>Duarte-Sustaita J, <sup>2</sup>Llanas-Wong JM, <sup>1</sup>Facio-Campos RA, <sup>1</sup>Moran-Martínez J, <sup>2</sup>Calleros-Rincón EY, <sup>2</sup>Perez-Morales R, <sup>2</sup>Olivas-Calderón E

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Coahuila, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Unidad Torreón Coahuila Gregorio A. García 198, Centro, 27000, Torreón, Coahuila.

<sup>2</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Avenida Artículo 123 s/n, 35010, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango.

<sup>3</sup>Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias de la Salud, Calzada Palmas 1 1122, Revolución, 35050, Gómez Palacio, Durango.

\*Email: [abigailmedinag@gmail.com](mailto:abigailmedinag@gmail.com) ; [eholivas27@gmail.com](mailto:eholivas27@gmail.com)

**Introducción:** La Comarca Lagunera de Durango es una región en la cual se han realizados pocos estudios para explorar la concentración de flúor (F) en agua y la exposición humana a este halógeno.

**Objetivo:** En este trabajo se evaluó y se comparó la concentración de flúor urinario (FU) en 60 puérperas con respecto a sus neonatos.

**Materiales y métodos:** Los binomios se reclutaron en el Hospital General de Gómez Palacio, Durango. Todas eran residentes de la Comarca Lagunera. La concentración de flúor se cuantificó por el método de electrodo de ion selectivo y se corrigió a través de la concentración de creatinina urinaria.

**Resultados:** El valor promedio de flúor urinario para puérperas y neonatos fue de  $1.91 \pm 2.75$  y  $2.34 \pm 4.44$  mg de F/g de creatinina, respectivamente. De acuerdo con nuestra evaluación, es evidente que la población estudiada presentó exposición crónica al flúor basado en los valores urinarios de referencia establecidos que van de 0-1.29 mg/g de creatinina. La ingesta total acumulada de flúor a través del agua de bebida y de la dieta en la población general, podría exceder fácilmente los niveles normales, causando intoxicación.

**Conclusión:** La evidencia sugiere que la ingesta excesiva de flúor puede contribuir a una amplia gama de efectos adversos como fluorosis dental, abortos problemas en el neurodesarrollo etc. Por lo tanto, desde una perspectiva de salud pública, parecería prudente y sensato que se implementen medidas de reducción de riesgos para disminuir la carga corporal total de flúor en la población susceptible.

**Palabras clave:** Flúor urinario, riesgos para la salud, binomio madre-hijo.



ciencias de la tierra, u.a.z.  
minas y metalurgia • geología • c. ambientales

**La Academia Nacional de Ciencias Ambientales  
y la Universidad Autónoma de Zacatecas**

**Francisco García Salinas**

**a través de**

**la Unidad Académica de Ciencias de la Tierra  
y la Licenciatura en Ciencias Ambientales**

Otorgan la presente

**CONSTANCIA**

**A:** Esperanza Yasmin Calleros Rincón, Rebeca Pérez Morales, José de Jesús Alba Romero, Alberto González Zamora, Bertha Yasmin Avalos Calleros, Edgar Héctor Olivas Calderón.

**Por:** Su participación como Ponente con el trabajo: "**METAHEMOGLOBINA Y CUERPOS DE HEINZ, COMO BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN A NITRATOS EN NIÑOS.**" en el marco del XVII Congreso Internacional, XXVIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, celebrado en la ciudad de Zacatecas, Zac., del 11 al 15 de junio de 2018

**Zacatecas, Zac., 15 de junio 2018**

**Dr. Alberto Pereira Corona  
Presidente ANCA**

**Dr. Santiago Valle Rodríguez  
Secretario ANCA  
Coordinador General Congreso 2018**



**XVII CONGRESO INTERNACIONAL**

**XXIII CONGRESO NACIONAL  
DE CIENCIAS AMBIENTALES**

**11 - 15 junio 2018**



**ANCA**

# **PROGRAMA DE ACTIVIDADES**

**Zacatecas, Zac.**



**XVII CONGRESO INTERNACIONAL Y  
XXIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS AMBIENTALES  
2018**



TER46	CARTEL	ESTUDIO HIDRODINÁMICO DE UNA LAGUNA DE ESTABILIZACIÓN CON GEOMETRÍA ESPIRAL UTILIZANDO CFD.	Obed Rodarte Arteaga, Horacio Inchaurregui Méndez, Karol Karla García Aguirre, Sergio Zavala Castillo.
TER47	CARTEL	ADAPTACIÓN AMBIENTAL DE LAS INNOVACIONES AGRÍCOLAS DEL CIMMYT, EN LOS SISTEMAS DE CULTIVO DE MAÍZ EN LA COMUNIDAD DE SAN SEBASTIÁN, METEPEC, ESTADO DE MÉXICO.	Violeta García Guadarrama, María Estela Orozco Hernández.
TER48	ORAL	EXTRACCIÓN DE NUEZ PECANA CARYA ILLINOIENSIS MEDIANTE ESTUFAS SOLARES: UN MÉTODO VERDE.	Yazmín Rodríguez Hernández, Hiram Hernández López, Gretel Mendoza Almanza.
TER49	ORAL	EVALUACION DE MATERIALES SECANTES PARA SU USO EN BAÑOS SECOS, EN EL CARRIZO, DURANGO.	Judith Amador Sierra, María Elena Pérez-López, Angélica López Gómez, Karla Yatziri Valles Arriaga.
TER51	CARTEL	RADIACIÓN SOLAR Y VIENTO PARA APROVECHAMIENTO DE ENERGÍAS RENOVABLES EN LA REGIÓN DE BAHÍA DE BANDERAS, NAY.-JAL., MÉX.	Fátima Maciel Carrillo González, Fernando Rodríguez González.

**TOXICOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL**

CLAVE	MODALIDAD	TÍTULO	AUTORES
TSA1	ORAL	PROCESOS BIOGEOGRÁFICOS ENFOCADOS A VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE <i>Triatoma recurva</i> EN CHIHUAHUA, MÉXICO.	María Elena Torres Olave, Gina Isabel Zesati Pereyra, Luis Carlos Alatorre Cejudo, Luis Carlos Bravo Peña, Mario Iván Uc Campos, Manuel Octavio González León, Lara Cecilia Wiebe Quintana, Alfredo Granados Olivas.
TSA2	CARTEL	FACTORES DE RIESGO Y EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS PARA APLICADORES EN HIDALGO, MÉXICO.	Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma, Urid Flores Cruz, Limary Guadalupe Franco Escobar, Itzel Isabel Trejo Reyes, Belén Madeline Sánchez Gervacio, Norma Barragán López, Josefina Reynoso Vázquez.
TSA4	ORAL	METAHEMOGLOBINA Y CUERPOS DE HEINZ, COMO BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN A NITRATOS EN NIÑOS.	Esperanza Yasmin Calleros Rincón, Rebeca Pérez Morales, José de Jesús Alba Romero, Alberto González Zamora, Bertha Yasmin Avalos Calleros, Edgar Héctor Olivas Calderón.
TSA5	CARTEL	IDENTIFICACIÓN DE GENOTOXICIDAD EN BIOINDICADORES, PRODUCIDA POR AGUAS RESIDUALES USADAS PARA RIEGO AGRÍCOLA.	Jessica Pérez Nava, Fernando Hernández Aldana, Carmen Martínez Valenzuela, Antonio Rivera Tapia, Víctor Tamariz Flores, Manuel Huerta Lara, Lilia Cedillo Ramírez, Ricardo Peña Moreno.
TSA6	CARTEL	EXPOSICIÓN DEL JITOMATE A NANOPARTÍCULAS METÁLICAS: ALTERACIÓN EN CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE CLOROFILA.	Jessica Denisse Valle-García, Jonathan Martín Amezquita-Ortiz, Paula Valeria González-García, Emiliano Mauricio Salinas-Guerra, Edgar Vázquez-Núñez.

## **METAHEMOGLOBINA Y CUERPOS DE HEINZ, COMO BIOMARCADOR DE EXPOSICIÓN A NITRATOS EN NIÑOS**

### **[METAHEMOGLOBIN AND HEINZ BODIES, AS A NITRATE EXPOSURE BIOMARKER IN CHILDREN]**

Esperanza Yasmin Calleros Rincón <sup>§1</sup>, Rebeca Pérez Morales<sup>1</sup>, José de Jesús Alba Romero<sup>2</sup>, Alberto González Zamora<sup>2</sup>, Bertha Yasmin Avalos Calleros<sup>3</sup>, Edgar Héctor Olivas Calderón<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Profesor investigador de la Facultad de Ciencias Química, Universidad Juárez del Estado de Durango, Campus Gómez Palacio, Dgo.

<sup>2</sup>Profesor investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Campus Gómez Palacio, Dgo

<sup>3</sup> Universidad Vizcaya de las Américas, Campus Torreón Coahuila,  
Av. Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia. Gómez Palacio, Dgo. México. C.P. 35010,  
Teléfono 01-871-7-15-88-10 Ext 126. § Autor para correspondencia [dra.ecallerorincon@ujed.mx](mailto:dra.ecallerorincon@ujed.mx)

### **RESUMEN**

En el área rural de la Comarca Lagunera de Durango, se tienen antecedentes de contaminación por nitratos en el agua debido a la sobrefertilización de los campos y el mal manejo de la disposición de las excretas del ganado, esto ha traído como consecuencia la contaminación de acuíferos y con ello la contaminación del agua para consumo humano sobre pasando lo que marca la NOM 127 SSA-1-1994, como nivel máximo permisible de 10 mg/l de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> los efectos adversos que ocasiona este contaminante se pueden dividir en crónicos como cáncer gástrico, linfoma de no Hodgkin, de páncreas; subcrónicos como hipotiroidismo, alteraciones en la reproducción; y agudos como la metahemoglobinemia, ésta última donde se basa la NOM 127 SSA-1 1994, para la prevención de éste padecimiento en niños menores de 12 años. La metahemoglobinemia es una enfermedad que se origina cuando el grado de oxidación del hierro contenido en el grupo hemo, supera los mecanismos compensadores de los hematíes, pasando al estado férrico, que es incapaz de transportar oxígeno y dióxido de carbono. Los cuerpos de heinz son partículas de hemoglobina desnaturalizada. El objetivo de este trabajo es establecer como biomarcador de exposición, la asociación del nivel de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en agua de consumo humano en niños de 1 a 12 años de edad, con los niveles de Metahemoglobina mayor al 1%, y la presencia de cuerpos de Heinz. Se realizó una convocatoria abierta en los centros de salud de cada comunidad para invitar a los niños de 1 a 12 años a través de sus padres, a los que se les dio una plática acerca del objetivo del estudio y los beneficios que obtendrían. De un total de 225 niños se seleccionó un tamaño de muestra de 103, que cumplieron con los criterios de inclusión: todos los niños con edad de 1 a 12 años residentes de La Loma, Sapioriz, Cd. Juárez, Juan E. García, Vicente Nava, Nazareno, El Salitral, Las Piedras y Las Cuevas, con un año o más de residencia, y consuman agua de la llave. El muestreo del agua se realizó de acuerdo a lo que marca la norma oficial mexicana. NOM 014-SSA-1-1993, la cuantificación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue por el método de electrodo ión selectivo y el análisis de porcentaje de metahemoglobina se realizó por el método de Ducie por espectrofotoetría de luz UV. En los resultados de agua, solo cuatro comunidades se encuentran dentro de lo que marca la NOM 127SSA-1-1994 y 6 comunidades por arriba de lo que indica la NOM, la

concentración de metahemoglobina fue mayor en las niñas, aunque ésta diferencia con respecto a los niños no fue significativa. Por otro lado, al asociar las concentraciones de los niveles de exposición con los cuerpos de Heinz se encontró una correlación altamente significativa ( $p<0.01$ ;  $r=0.778$ ). En relación a los resultados encontrados, se concluye que existe una asociación negativa entre Metahemoglobina y cuerpos de Heinz. Así como la concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se asocia con los valores de los cuerpos de Heinz no así con Metahemoglobina. Se encontraron diferencias altamente significativas entre los cuerpos de Heinz siendo mayor en niños que en niñas, el porcentaje de metahemoglobina es un biomarcador de exposición a N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Palabras clave: *agua, cuerpos de heinz, biomarcador, nitrógeno de nitrato, metahemoglobina.*

**REVista INTernacional de**  
**CONTAMinación**  
**AMBIEntal**

**volumen 34, 2018**

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/>

**MEMORIAS**

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2018**

**EN MEMORIA DEL  
DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI  
1936 - 2018**

**SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA**

**Editores**

**JUANA SÁNCHEZ-ALARCÓN  
EDITH CORTÉS-BARBERENA  
RAFAEL VALENCIA-QUINTANA**

DOI: 10.20937/RICA.2018.34.MSMG2

**REVista INTernacional de**

# **CONTAMinación AMBIEntal**

**volumen 34, 2018**

**ISSN – 0188 4999**

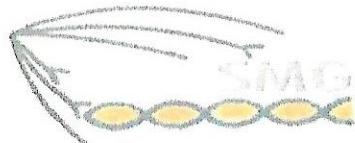
<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/>

**MEMORIAS**

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2018**

EN MEMORIA DEL  
**DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI**  
1936 -2018

<b>AUTOR</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>M</b>	
Machain-Williams C	61
Madrigal-Bujaidar E	32
Maldonado-Delgado S	68
Mar-Silva AF	59
Martínez-Mendoza N	17
Martins M	23
Mateos Nava RA	37, 49
Mejía Pérez L	57
Mejía Sánchez F	11
Meléndez Valenzuela A	41
Mello Cerato B	63, 67
Méndez Hernández EM	5, 6, 12, 18, 20, 22
Milic M	66
Minor-Caballero AE	64
Montenegro-Morales LP	33
Montiel González JMR	65, 67
Morales-Madrigal LM	40, 52
Moreno-Santillán D	2, 61
Muñoz Yañez C	50
Muñoz-Nava H	69
<b>N</b>	
Nava Serrano S	27
<b>O</b>	
Ochoa-Ocaña MA	66
Olivares Eslava M	26
Olivas Calderón EH	, 40, 70
Olivas Linares OL	5
Olivera Gómez LD	9, 10
Orta Estrada RA	11
Ortega Sánchez ME	60
Ortega-García AL	29
Ortega-Hernández G	32
Ortega-Reyes J	61
Ortiz Muñiz AR	51, 57
Ortiz Muñiz R	57
<b>P</b>	
Pablo-Cahua JA	54



# Congreso Nacional de Genética 2018

Sociedad Mexicana de Genética A.C.

60 años de la publicación de la duplicación semiconservativa

La Sociedad Mexicana de Genética  
y el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral  
Regional-IPN Durango  
otorgan la presente



## CONSTANCIA

A: Morales-Madrigal LM, Gendarilla-Esparza DD, Pérez-Morales R,  
González-Zamora A, Calleros-Rincón EY

Por la presentación del trabajo titulado

DAÑO GENOTÓXICO EN MUJERES CON EXPOSICIÓN CRÓNICA A NITRATOS EN AGUA DE BEBIDA

En el Congreso Nacional de Genética 2018, de la Sociedad Mexicana de Genética  
Efectuado del 7 al 9 de noviembre de 2018  
en el CIIDIR-IPN Durango

---

Dra. Edith Cortés Barberena  
Sociedad Mexicana de Genética A.C.  
Presidente (2017-2019)

---

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz  
Instituto Politécnico Nacional  
CIIDIR, Durango  
Director

CNG2018 058

## DAÑO GENOTÓXICO EN MUJERES CON EXPOSICIÓN CRÓNICA A NITRATOS EN AGUA DE BEBER

Morales-Madrigal LM<sup>1</sup>, Gendarilla-Esparza DD<sup>1</sup>, Pérez-Morales R<sup>1</sup>, González-Zamora A<sup>2</sup>, Calleros-Rincón EY<sup>1\*</sup>

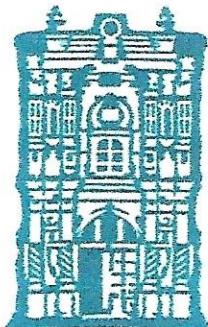
<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Departamento de Posgrado e Investigación.  
Facultad de Ciencias Químicas, UJED. Artículo 123 S/N. Col. Filadelfia. C.P. 35010.  
Gómez Palacio, Durango. México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Evolutiva. Facultad de Ciencias Biológicas, UJED.  
Av. Universidad S/N. Fracc. Filadelfia. C.P. 35010. Gómez Palacio, Durango, México.  
\*dra.ecallerosrincon@ujed.mx

El nitrato es un compuesto presente en la naturaleza de manera común, se puede encontrar en el agua, suelo y algunos alimentos, principalmente en vegetales. Este compuesto es de gran importancia y es uno de los contaminantes en el agua de uso humano, el cual ha aumentado debido a las actividades antropocéntricas como el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados y el mal manejo de las excretas del ganado, causando repercusiones en la salud. La alta ingesta de nitratos se ha relacionado con diversas enfermedades, entre las más relevantes destacan alteraciones bioquímicas y hematológicas como metahemoglobinemía, hipotiroidismo, modificaciones histopatológicas, cambios genómicos y cáncer. La zona rural de Cd. Lerdo, Dgo., presenta una contaminación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua para consumo humano que se encuentra en el rango de 12 – 45 mg/L rebasando el límite máximo permisible (LMP) por la NOM-127-SSA de 10 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El objetivo fue determinar el daño genotóxico en mujeres de 18 a 45 años de edad que consumen agua contaminada por nitratos. Se recabaron muestras de 452 mujeres con más de 1 año de residencia en la zona y que consumen agua de la llave. Se obtuvo una carta de consentimiento informado firmada y se recolectó sangre en tubo con heparina de litio para el cultivo de linfocitos. El daño genotóxico fue analizado por la técnica de micronúcleos en células binucleadas, estratificando y realizando una comparación entre los participantes que residen en comunidades rurales con un nivel permisible de nitrato (testigo) y los que residen en comunidades rurales que rebasan el LMP (expuesto). Los resultados muestran que el índice de división celular en ambos grupos fue similar y dentro de los parámetros normales ( $p=0.109$ ); en cuanto a las células binucleadas hay un porcentaje menor en el grupo expuesto ( $p=0.048$ ); en cuanto a la apoptosis celular, células binucleadas con micronúcleos y células binucleadas con puente se encuentra un aumento de su porcentaje en el grupo expuesto. Se concluye que existe daño genotóxico en las mujeres que residen en las zonas rurales con mayor concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua que utilizan para consumo diario.

# LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO Y LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS GÓMEZ PALACIO

en el marco



Otorgan la presente:

## CONSTANCIA

A: Alba Romero José de Jesús, Pablo Ruiz Flores, Esperanza Yazmín Cilleros Rincón, Sandra Isabel Hernández González, Aurora Martínez Romero, Gonzalo Alonso Flores Vielma

Por su valiosa participación como **PONENTES DEL CARTEL**:

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO DE *Moringa oleifera* Y LA CMI POR EL MICROMÉTODO ALAMAR AZUL EN MICROORGANISMOS CAUSANTES DE GASTROENTERITIS”**

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**

Gómez Palacio, Dgo., a 08 de Octubre de 2018

Dr. Juan José Martínez García

Director de la FCQ-UJED



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Dra. Concepción García Luján

Jefa de la División de Estudios de Posgrado e Investigación

## DETERMINACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO DE *Moringa oleifera* Y LA CMI POR EL MICROMÉTODO ALAMAR AZUL EN MICROORGANISMOS CAUSANTES DE GASTROENTERITIS.

<sup>1,2,3</sup>Alba Romero José de Jesús, Pablo Ruiz Flores<sup>4</sup>; Esperanza Yazmín Calleros Rincón<sup>1</sup>, Sandra Isabel Hernández González<sup>1</sup>; Aurora Martínez Romero<sup>1</sup>, Gonzalo Alonso Flores Vielma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Estudios de Posgrado e Investigación. Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. CP 35010. Tel (871) 7 15 88 10 y 7 15 29 64.

<sup>2</sup>Laboratorio de Asesores Especializados de la Laguna, Gómez Palacio, Durango.

<sup>3</sup>Sanatorio San José de Gómez Palacio Durango SA de CV.

<sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica Facultad de Medicina de la UA de C

\* Email: [Jalbar\\_1@hotmail.com](mailto:Jalbar_1@hotmail.com)

**Introducción:** El uso de plantas con fines terapéuticos es bien conocido en todo el mundo. La familia *Moringaceae* compuesta por 13 especies, de las cuales *Moringa oleifera* Lam. (*Moringa*), es la especie más utilizada por las comunidades indígenas. Estudios in vitro han demostrado la actividad antimicrobiana de *Moringa oleifera* de diferentes partes de la planta sobre los microorganismos patógenos. Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad entre lactantes y niños y las personas de la tercera edad. Los esfuerzos de los investigadores por buscar alternativas para combatir este problema que se presenta más en países en desarrollo proponen el uso de extractos de *M. oleifera*.

**Materiales y métodos:** Se obtuvieron muestras de hojas, tallos, flores y semillas de *Moringa oleifera* de una misma planta. Se prepararon extractos metanólicos al 96% cubriendo el material en su totalidad. Las cepas utilizadas fueron donadas por el departamento de bacteriología médica de la ENCB. En una placa costar de baja evaporación se inocularon las diferentes cepas junto con el extracto de *Moringa oleifera* a diferentes concentraciones, se incubaron durante toda la noche a 36°C y posteriormente se agregó reactivo de Alamar Azul.

**Resultados:** En nuestro estudio se obtuvo un extracto etanólico de tallos y hojas de la misma planta, se determinó la CMI por el micrométodo de Alamar azul a las 24 h en cepas ATCC de *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella entérica*, *Shigella spp*, *Escherichia coli*, la cual fue 3.125 mg/dL como la menor CMI en hojas y 12.5 mg/dL como la mayor CMI, sin embargo se determinó que si tiene efecto bactericida con mayor efecto en hojas que el tallo. Además, se determinó que una concentración de 12.5 mg/mL inhibe a los 4 microorganismos, siendo una alternativa para la población carente de asistencia social.

**Conclusión:** Los extractos alcohólicos de *Moringa oleifera* tienen efecto bactericida sobre *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella entérica*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*. Además, el micrométodo de Alamar Azul es un método más objetivo y determina la CMI de manera cuantitativa. **Palabras Clave:** *Moringa oleifera*, Alamar Azul.

**REVista INTernacional de**  
**CONTAMinación**  
**AMBIEntal**

**volumen 34, 2018**

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/>

**MEMORIAS**

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2018**

**EN MEMORIA DEL  
DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI  
1936 - 2018**

**SOCIEDAD MEXICANA DE GENÉTICA**

**Editores**

**JUANA SÁNCHEZ-ALARCÓN  
EDITH CORTÉS-BARBERENA  
RAFAEL VALENCIA-QUINTANA**

DOI: 10.20937/RICA.2018.34.MSMG2

**REVista INTernacional de**

# **CONTAMinación AMBIEntal**

**volumen 34, 2018**

**ISSN – 0188 4999**

<http://www.revistas.unam.mx/index.php/rica/>

**MEMORIAS**

**CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2018**

EN MEMORIA DEL  
**DR. RAFAEL VILLALOBOS PIETRINI**  
1936 -2018

<b>AUTOR</b>	<b>PÁGINA</b>
Esquivel-Rodríguez E	18
Estrada-Guzmán JC	43
<b>F</b>	
Fernández MG	63
Flores Márquez AR	30
Flores-Alfaro E	54, 55
Flores-Gracia J	13
Flores-Loyola CM	19
Flores-Márquez AR	31, 39, 66, 68
Francisco-Aguilar DG	54
Françoso E	63
<b>G</b>	
Galaviz Hernández C	35
Gandarilla-Esparza DD	52
García Arenas G	44
García Garza R	46
García Rodríguez MC	51
García-Magallanes N	4
García-Melo LF	32
García-Pérez LV	54
García-Torres E	40
García-Vargas G	18
García-Zavala JJ	23
Gaytán Oyarzún JC	36
Gaytán-Esparza A	22
Gómez-Arroyo S	30, 31, 39, 66
Gómez-Olivares JL	64, 65, 66, 67, 68, 69
Gómez-Zamudio J	55
González Galarza FF	47
González Gutiérrez AM	51
González-Herrera E	16
González-Romero Á	3
González-Zamora A	52
Grada-Yautentzi JAR	69
Graniel Guerrero J	57
Gregorio Jorge J	64
Guerrero Sánchez EA	35
Guijarro-Bustillos J	22
Gutiérrez-Nájera TM	62

Sociedad Mexicana de Genética A.C.

60 años de la publicación de la doble hélice

La Sociedad Mexicana de Genética  
y el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral  
Regional-IPN Durango  
otorgan la presente

# CONSTANCIA

A: García-Torres E, Pérez-Morales R, Olivas-Calderón EH,  
Morales-Madrigal LM, Calleros-Rincón EY

POR HABER OBTENIDO EL TERCER LUGAR EN EL CONCURSO DE CARTELES DE DOCTORADO CON EL TRABAJO:

HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO Y SU RELACIÓN CON LA VARIANTE GÉNICA DE *FOXE1* EN  
FAMILIAS DE LA ZONA RURAL DE CD. LERDO, DURANGO

En el Congreso Nacional de Genética 2018, de la Sociedad Mexicana de Genética  
Efectuado del 7 al 9 de noviembre de 2018  
en el CIIDIR-IPN Durango

Dra. Edith Cortés Barberena  
Sociedad Mexicana de Genética A.C.  
Presidente (2017-2019)



Dr. Eduardo Sánchez Ortiz  
Instituto Politécnico Nacional  
CIIDIR, Durango  
Director

CNG2018 046

## HIPOTIROIDISMO SUBCLÍNICO Y SU RELACIÓN CON LA VARIANTE GÉNICA DE *FOXE1* EN FAMILIAS DE LA ZONA RURAL DE CD. LERDO, DURANGO

García-Torres E, Pérez-Morales R, Olivas-Calderón EH, Morales-Madrigal LM, Calleros-Rincón EY\*

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Departamento de Posgrado e Investigación.  
Facultad de Ciencias Químicas, UJED. Artículo 123 s/n. Col. Filadelfia.  
C.P. 35010. Gómez Palacio, Dgo. México.  
dra.ecallerosrincon@ujed.mx

El hipotiroidismo es causado por una baja síntesis y secreción de hormonas tiroideas. Acorde al tiempo de aparición se denomina congénito o adquirido, al nivel de disfunción primario o secundario y según la severidad clínico o subclínico; sin embargo, el diagnóstico del hipotiroidismo subclínico representa un reto y requiere un análisis del perfil tiroideo para lograr su detección temprana. La prevalencia mundial es del 4.3 % y en México afecta al 8% de la población, puede presentarse a cualquier edad y afecta principalmente a mujeres. Su etiología es multifactorial donde los principales factores causales son ambientales, inmunológicos, nutricionales y genéticos. Dentro de los factores genéticos tenemos a *FOXE1*, factor de transcripción específico implicado en la organogénesis y diferenciación tiroidea; la variante génica *FOXE1 rs965513* ha sido asociada con varias alteraciones tiroideas, incluyendo casos esporádicos y familiares de hipotiroidismo, así como cáncer de tiroides. En estudios previos se observó una prevalencia de 20% de hipotiroidismo subclínico en mujeres residentes del área rural de ciudad Lerdo Durango, quienes refirieron que había más de un caso en su familia. En este estudio se analizó la variante *FOXE1 rs965513* en 62 integrantes de 11 familias; se determinaron los perfiles tiroideos por quimioluminiscencia y se realizó la extracción de ADN por salting out, mientras que los genotipos se determinaron por PCR en tiempo real con sondas de hibridación específica. Se encontraron 24 casos de hipotiroidismo en las 11 familias: 3 familias con 1 caso, 3 con 2 casos y 5 familias con 3 casos. Con respecto a los genotipos, se han analizado 18 individuos, 39% tiene un genotipo heterocigoto G/A y el 61% un genotipo homocigoto silvestre G/G, aun no se ha encontrado un genotipo homocigoto polimórfico A/A. Por lo anterior, el factor genético no parece ser condicionante de hipotiroidismo subclínico ya que 6 casos muestran un genotipo homocigoto silvestre G/G y solo un caso corresponde al genotipo heterocigoto G/A. Sin embargo, es necesario concluir con los genotipos y analizar la segregación de alelos, así como la presencia y frecuencia del polimorfismo A/A en todos los individuos.



Federación Nacional de Químicos Clínicos, CONAQUIC A.C.

afiliado a la

DGP F-370

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine  
y  
el Colegio de Químicos de Tabasco A.C.



Otorgan el presente

# Reconocimiento

a

**Dra. José de Jesús Alba Romero, Pablo Ruiz Flores, Esperanza Yazmín Calleros Ricón,  
Sandra Isabel Hernández González, Damari Lizeth Alba Romero y Aurora Martínez Rom**

por su participación en el concurso de trabajos libres, con el tema:

**Evaluación del efecto regenerador de los factores de crecimiento obtenidos de  
Plasma Rico en Plaquetas en úlceras vasculares.**

En el marco del XLII Congreso Nacional de Químicos Clínicos y Expoquím, Tabasco 2018.

Realizado del 13 al 15 de septiembre del 2018.

Llave digital: NDM=VEw=NDM=7

Quím. David Gámez Córdova  
Secretario de Educación Continua

Villahermosa Tabasco a 15 de septiembre del 2018.

M en C. Alejandra Anilben Cano Huizar  
Presidente CONAQUIC, A.C.

Quím. Elizabeth Karam Romano  
Presidente Del Colegio de Químicos de Tab

EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA Y LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



otorgan la presente

**CONSTANCIA**

a:



*Leslie Madhai Morales Madrigal*



Por haber participado en el V Congreso Interinstitucional de Jóvenes Investigadores con su proyecto: Determinación del porcentaje de metahemoglobina en personas que consumen agua contaminada por nitratos



Asesor: Dra. Esperanza Yasmin Calleros Rincón

Área: Medicina y Ciencias de la Salud

Monterrey, N.L. Noviembre de 2018

DR. JUAN MANUEL ALÓOCER GONZÁLEZ  
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA  
Y DESARROLLO TECNOLÓGICO



MTRA. DIMPNA CISELA MORALES GONZALEZ  
DIRECTORA DE VINCULACIÓN DEL CONACYT

AEROPLANA VERITATIS



## CARTA DE AUTORIZACIÓN

En la ciudad de Gómez Palacio, Dgo a los 20 días del mes de septiembre de 2018, manifestamos que es nuestra libre voluntad autorizar la publicación del trabajo titulado **“determinación del porcentaje de metahemoglobina en personas que consumen agua contaminada por nitratos”** de la cual somos autores, en la **Memoria del 5to. Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Durango**, que será publicada y divulgada por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango.

Extiendo la presente para los fines legales a que haya lugar.

**Atentamente**

Nombre: autor: Leslie Madhai Morales Madrigal

Firma: Leslie Madhai Morales Madrigal

Nombre asesor de tesis: Dra. Esperanza Yasmin Calleros Rincón.

## **Determinación del porcentaje de metahemoglobina en personas que consumen agua contaminada por nitratos**

**Morales-Madrigal L.M., García-Torres, E., Pérez-Morales R., Olivas-Calderón E.H., Gómez-Zamora A., Calleros-Rincón E. Y.\***

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Departamento de Posgrado e Investigación. Facultad de Ciencias Químicas, UJED. Artículo 123 s/n. Col. Filadelfia. C.P. 35010. Gómez Palacio, Dgo. México.

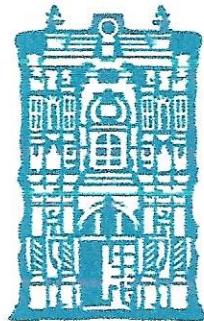
\*[dra.ecallerosrincon@ujed.mx](mailto:dra.ecallerosrincon@ujed.mx)

El nitrato es un compuesto químico de gran importancia y de los principales contaminantes en el agua de consumo humano, éste ha aumentado debido a actividades antropocéntricas, como el uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, repercutiendo en la salud. La alta ingesta de nitratos se ha relacionado con alteraciones hematológicas como metahemoglobinemia. La zona rural de Cd. Lerdo, Dgo., presenta una contaminación de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua para consumo humano con un rango de 12 – 45 mg/L rebasando el límite máximo permisible por la NOM-127-SSA de 10 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El objetivo fue determinar el porcentaje de metahemoglobina en personas expuestas a través de consumo de agua contaminada. Se incluyeron 107 con más de 1 año de residencia en la zona y que consumen agua de la llave. Se obtuvo una carta de consentimiento informado firmada y se recolectó sangre en tubo con EDTA para la determinación de metahemoglobina por espectrofotometría (Sakata, 1982). De 107 personas un 84% presentó niveles de metahemoglobina superiores al valor de referencia (1.5%). El 55% bebe agua entubada y el 59% cocina con la misma. En conclusión, existe un elevado porcentaje de metahemoglobina en las personas que residen en zonas rurales que consumen agua contaminada.

Palabras clave: nitratos, metahemoglobina, zonas rurales

**LA UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
y la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio**

en el marco



Otorgan la presente:

***CONSTANCIA***

**A: ESPERANZA YASMÍN CALLEROS RINCÓN**

Por su valiosa participación como *ASISTENTE* al:

**“12° Simposium Internacional de  
Ciencias Químicas”  
Edición 2018.**

Efectuado del 08 al 12 de Octubre del 2018.

**“POR MI RAZA HABRÁ EL ESPÍRITU”**

Gómez Palacio, Dgo., a 12 de Octubre de 2018.

Dr. Juan José Martínez García

Director de la FCQ-UJED



**DIRECCIÓN**

M.C. Verónica Yazmín Mejía García

Secretaria Académica FCQ-UJED

# Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana

Comparative analysis of different DNA extraction methods and their genotyping efficiency in Mexican population

Efraín Ríos-Sánchez\*, Esperanza Calleros\*, Alberto González-Zamora\*\*, Julieta Rubio\*\*\*,  
 Ollin C. Martínez\*\*\*\*, Aurora Martínez\*, Sandra Hernández\*, Rebeca Pérez-Morales\*

## RESUMEN

Los estudios de variabilidad genética han reportado inconsistencias de resultados entre poblaciones, en gran medida, debido a que los métodos de extracción de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) y las técnicas de genotipificación son altamente variables entre ellas, lo que conduce a la asignación errónea de genotipos. El objetivo de este estudio es comparar distintas técnicas de extracción de DNA y de genotipificación de polimorfismos. Para llevar a cabo el estudio, se analizó el DNA de 10 muestras sanguíneas correspondientes a individuos mestizos mexicanos, y se purificó por los métodos de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (FCI), gradiente de sales (GS), gradiente de sacarosa (GSC), DNAzol® y DNeasy Blood & Tissue Kit ®. Se genotipificaron los polimorfismos *GSTT1*\*0 y *GSTM1*\*0 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) múltiple, *CYP1A1*\*2C por RFLP's y *AhR Arg554Lys* por PCR tiempo real. Los resultados mostraron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en cantidad, pureza e integridad entre los distintos métodos. En los análisis moleculares se observó que el método de FCI presenta inhibidores de la reacción de PCR, ya que no fue posible amplificar los fragmentos por PCR múltiple y PCR punto final, aunque si hubo amplificación en el PCR tiempo real. Los métodos GS y GSC amplificaron todas las muestras en las tres modalidades de PCR y mostraron resultados concordantes, mientras que solo el 80% de las muestras extraídas mediante DNAzol ® y DNeasy ® amplificaron, y los resultados no fueron concordantes para DNAzol ® (50%) y DNeasy ® (80%) en el análisis de PCR - RFLP's. Los métodos de extracción GS y GSC mostraron mayor recuperación de DNA, con parámetros de calidad e integridad óptimos para los análisis moleculares por PCR.

Recibido: 29 de octubre de 2015  
 Aceptado: 28 de junio de 2016

### Palabras clave:

Extracción de DNA; genotipificación; SNP; polimorfismos; PCR; variabilidad genética; México.

### Keywords:

DNA extraction; genotyping; SNP; polymorphisms; PCR; genetic variability; Mexico.

### Cómo citar:

Ríos-Sánchez, E., Calleros, E., González-Zamora, A., Rubio, J., Martínez, O. C., Martínez, A., Hernández, S., & Pérez-Morales, R. (2016). Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria*, 26(4), 15-24. doi: 10.15174/au.2016.1078

## ABSTRACT

Genetic variability studies have presented inconsistencies between populations, mainly because methods of deoxyribonucleic acid (DNA) extraction and genotyping techniques show high variability between them, leading to an erroneous assignment of genotypes. The objective of this study is compare different techniques for DNA extraction and genotyping of polymorphisms. To perform this study, DNA from 10 blood samples corresponding to mestizo Mexicans was analyzed and purified by methods of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCA), salting out gradient (SG), sucrose gradient (SCG), DNAzol ® method and DNeasy Blood & Tissue Kit ®. *GSTT1*\*0 and *GSTM1*\*0 polymorphisms were genotyped by multiplex PCR, *CYP1A1*\*2C by PCR-RFLP's assay and *AhR Arg554Lys* by real-time PCR. Results shown that amount, purity and integrity of DNA were evaluated. Different methods results showed significant differences ( $p < 0.001$ ). Molecular analyses showed that PCA method presents inhibitors for PCR reaction because it was not possible to amplify fragments in multiplex PCR and endpoint. Although, there was amplification in real time PCR. SG and SCG methods amplified all samples in three types of PCR and the results were concordant between them. While in PCR - RFLP analysis, samples extracted by DNAzol ® and DNeasy ® amplified only 80% of samples with no concordant results (50% for DNAzol ® and 80% for DNeasy ®). SG extraction methods and SCG showed higher DNA recovery, with optimal quality parameters for molecular analyses by PCR.

\* Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Artículo 123 s/n, Col. Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México, C.P. 35010. Tel.: (871) 7 15 88 10, ext. 118; fax (871) 7 15 29 64. Correo electrónico: rebecamps@ujed.mx

\*\* Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. Av. Universidad s/n, Col. Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México, C.P. 35010.

\*\*\* Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, C.P. 04510. Apartado Postal 70228.

\*\*\*\* Escuela de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Universidad núm. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, C.P. 62209.

## INTRODUCCIÓN

La naturaleza hereditaria de todo organismo es definida por su genoma. Debido a la gran importancia de esta molécula y al surgimiento de la tecnología del ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) recombinante, se han diseñado numerosas pruebas útiles en diversas áreas de investigación, como las ciencias médicas, biológicas, antropológicas, forenses, entre otras, así como en la generación de bancos de DNA y germoplasma que se han establecido con diversos fines (Eguiarte, Souza & Aguirre, 2007).

Entre las técnicas más utilizadas en la manipulación del DNA se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), de la cual existen variantes como la PCR punto final, PCR tiempo real, PCR inversa, PCR anidada, PCR mutagénico, entre otras. Para realizar esta técnica es necesario contar con una muestra libre de proteínas, tanto citoplasmáticas como nucleares que se encuentran asociadas al DNA. Por ello, la extracción del DNA genómico es un paso crucial cuando se desean realizar estudios moleculares, ya que existe variabilidad según el método de extracción utilizado, pues puede proveer contaminación residual con sales y solventes (Blanco-Jarvio, Martínez & Bautista, 2014).

Se han reportado diversas técnicas de extracción con métodos relativamente sencillos y de bajo costo; una de ellas es el método de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (FCl), considerado uno de los más eficaces para cualquier tipo de muestra. Sin embargo, este procedimiento es laborioso y utiliza compuestos tóxicos que pueden ser peligrosos para el investigador que los manipula, además de contener inhibidores para la reacción de PCR, como el fenol y el cloroformo, por lo que se debe añadir un paso adicional en la extracción, generalmente la filtración en columnas específicas, o realizar varios lavados para eliminar los residuos de los disolventes (Baena, Ramos, Gómez & Gómez, 2013).

Lahiri & Nurnberger (1991) reportaron un método de extracción por gradiente de sales ( $MgCl_2$ , KCl, NaCl, EDTA, Tris-HCl) para extraer DNA de suficiente calidad para el análisis molecular por *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Este método reduce la exposición a compuestos químicos peligrosos y, aunque es un método barato y libre de inhibidores, presenta el inconveniente de ser muy laborioso. Daly, Steen, Fairbrother & Idle (1996) reportaron un método que consiste en purificar el DNA mediante la desproteinización con ácido perclórico y la lisis de membranas con un amortiguador

rico en sacarosa,  $MgCl_2$  y la adición de Tritón X-100 como detergente. Los autores señalan que esta técnica es económica y permite la recuperación de grandes fragmentos de DNA (hasta 30 kb); esta característica es muy importante cuando se requiere amplificar fragmentos de alto peso molecular o generar bibliotecas de DNA genómico.

Por otro lado, se encuentran disponibles a nivel comercial otros productos para purificar el DNA, como es el caso del DNAzol ® o de kits completos, que cuentan con todos los amortiguadores y materiales necesarios para realizar una extracción muy sencilla y en corto tiempo, como los kits de casas comerciales que han desarrollado estos métodos de extracción rápida de DNA; aunque son reproducibles y se obtiene material de alta pureza y peso molecular, la principal limitante del uso de estos métodos es el costo y la poca cantidad de DNA recuperada.

De acuerdo con lo anterior, al elegir el método de extracción del DNA es importante realizar una evaluación detallada del material genómico necesario para la investigación y del procedimiento que se le aplicará a la muestra, ya que los métodos rápidos y automatizados generalmente se utilizan para procesar un número pequeño de muestras que requiere poca cantidad de DNA (ng o pg), mientras que la generación de bancos genómicos y la obtención de material con suficiente calidad para clonación requiere de un reservorio que cuente con una gran cantidad de DNA, a veces en el orden de los  $\mu$ g, que la molécula sea de elevado peso molecular y libre de inhibidores de la PCR (Caboux *et al.*, 2012; Green & Sambrook, 2012).

De modo paralelo, los estudios de epidemiología molecular reportan las frecuencias de ciertos polimorfismos de interés, en poblaciones específicas, que son asociados con la susceptibilidad genética a determinadas enfermedades. Sin embargo, no existen criterios unificados para llevar a cabo la genotipificación, por tanto, la confiabilidad en la asignación de genotipos es variable y depende de la calidad del DNA purificado y de la técnica utilizada para genotipificar, lo que puede conducir a resultados erróneos que tienen bases metodológicas. Se ha establecido que el estándar de oro es la genotipificación por PCR tiempo real (Gaedigk *et al.*, 2015), por su alta sensibilidad y especificidad, no obstante presenta el inconveniente de tener mayor costo, por lo que muchos laboratorios que no cuentan con infraestructura y recursos suficientes recurren a la genotipificación por PCR – RFLP's, el cual es un método sensible, aunque se debe tener en cuenta la posible

presencia de inhibidores de la PCR y de las enzimas de restricción, así como la longitud de los fragmentos amplificados, para tener una mejor resolución del patrón de bandas.

En este contexto, los polimorfismos en los genes del receptor de arilos (*AhR*), el citocromo 1A1 (*CYP1A1*) y las glutatión transferasas M1 y T1 (*GSTM1* y *GSTT1*) han sido extensamente estudiados en múltiples poblaciones, y se ha observado una amplia variabilidad en las frecuencias reportadas, conduciendo a resultados inconsistentes con su asociación a cáncer, principalmente (Saitou & Ishida, 2015; Spink *et al.*, 2014). No obstante, es posible que estas inconsistencias sean debidas a errores metodológicos relacionados con la asignación de genotipos, como se mencionó anteriormente, y por lo cual la extracción del DNA y el método de genotipificación presentan alta variabilidad.

En el presente trabajo se compararon los rendimientos de distintas técnicas de extracción de DNA: FCI, GS, GSC, DNAzol ® (cat. DN129) y *DNeasy Blood & Tissue Kit* ® (cat. 69506), para evaluar los principales parámetros en la calidad del DNA y su posterior uso en el análisis molecular por PCR múltiple, PCR – RFLP's y PCR tiempo real para analizar la reproducibilidad de las técnicas de genotipificación de los polimorfismos *AhR Arg554Lys* (rs2066583), *CYP1A1 Ile482Val* (rs1048943), *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* que presentan una amplia variabilidad en la frecuencia, según la población analizada, y para estudiar la asociación a ciertos tipos de cáncer.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 10 individuos mestizos mexicanos no relacionados, clínicamente sanos. Los participantes firmaron una carta de consentimiento informado; el protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Las muestras fueron colectadas en vacutainer con EDTA. Se realizaron 5 alicuotas de 1 ml de cada muestra y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su uso. Cada alicuota de 1 ml se utilizó para extraer el DNA por los distintos métodos. Un total de 50 muestras fueron purificadas por los cinco métodos, es decir, las 10 muestras por cada método, y fueron analizadas por tres distintas técnicas de PCR para genotipificación de polimorfismos.

### Métodos de extracción de DNA

Todos los reactivos y solventes utilizados fueron grado biología molecular de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Técnica de extracción por Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (FCI) (Green & Sambrook, 2012)

La extracción se llevó a cabo a partir de 1 ml de sangre periférica. Se agregaron 50 µl de SDS al 20%, se mezcló por inversión, se añadió 1 ml de fenol y se incubó 5 min a 65 °C; inmediatamente después se incubó a -20 °C durante 5 min. Se centrifugó la muestra durante 10 min a 10 000 rpm y se recuperó la fase acuosa en otro tubo, donde se agregaron 500 µl de la mezcla FCI en proporción 25:24:1, preparada al momento de adicionarlo. Se centrifugó la muestra a 12 000 rpm y se recuperó la fase acuosa, que fue adicionada a dos volúmenes de etanol absoluto frío. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min para recuperar el DNA, después de la evaporación del etanol se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas y se resuspendió en incubación a 65 °C durante 15 min. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

Técnica de extracción por gradiente de sales (GS) (Lahiri & Nurnberger, 1991)

La extracción se llevó a cabo a partir de 1 ml de sangre periférica, se agregó 1 ml de amortiguador TKM1 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA) y 25 µl de Igepal. Se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2200 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 ml de amortiguador TKM1 y se centrifugó a 2200 rpm durante 10 min. Se realizaron los lavados hasta obtener la fracción blanca. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 160 µl de amortiguador TKM2 (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 0.4 M NaCl). Se adicionaron 10 µl de SDS 10% y se incubó a 55 °C durante 10 min. Posteriormente se agregaron 120 µl de NaCl 3 M y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 min. Se recuperaron 500 µl del sobrenadante y se adicionaron a otro tubo que contenía dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló por inversión varias veces hasta observar la hebra de DNA precipitada por el etanol y se recuperaron las hebras, que fueron lavadas con etanol frío al 70%. Se recuperó el DNA y después de la evaporación del etanol se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas. Se resuspendió en incubación a 65 °C durante 15 min. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

Técnica de extracción por gradiente de sacarosa (GSC)  
(Daly *et al.*, 1996)

La extracción se llevó a cabo a partir de 1 ml de sangre periférica a la que se le agregaron 9 ml de amortiguador de lisis (320 mM sacarosa, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Tritón X-100, 10 mM Tris - HCl pH 7.4), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 400 µl de amortiguador de suspensión (150 mM NaCl, 60 mM EDTA, 1% SDS, 400 mM Tris - HCl pH 7.4) con 100 µl de NaClO<sub>4</sub> 5 M. La suspensión fue mezclada en un agitador rotatorio por 15 min a temperatura ambiente (TA) e incubada a 65 °C por 30 min. Posteriormente, se le agregaron 400 µl de cloroformo a -20 °C y la mezcla se mantuvo en agitación por 10 min, seguido de centrifugación a 1400 rpm por 10 min. Se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto a la fase acuosa y se mezcló hasta que la hebra de DNA precipitara. Se recuperaron las hebras y se lavaron con etanol al 70%. Se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas y se resuspendió en incubación a 65 °C durante 15 min. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

### Extracción con DNAzol ® BD de Molecular Research Center (Cat. DN129)

Se siguieron las especificaciones del fabricante, las cuales se detallan a continuación. La extracción se llevó a cabo a partir de 500 µl de sangre periférica, se le agregó 1 ml del reactivo DNAzol. Se mezcló por 20 s y se incubó a temperatura ambiente (TA) por 5 min. Se agregaron 400 µl de isopropanol, se agitó en vórtex y se incubó 5 min a TA. Se centrifugó la muestra a 8000 rpm durante 6 min. Se decantó el sobrenadante y se reservó la pastilla, se agregaron 500 µl de DNAzol y se mezcló hasta que se incorporara con la solución. Se centrifugó la muestra a 8000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se reservó la pastilla. Se agregó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 8000 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se adicionaron 50 µl de agua libre de nucleasas, el DNA fue resuspendido en incubación a 65 °C durante 15 min. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

### Extracción con DNeasy Blood & Tissue de Quiagen ® (Cat. 69506)

Se siguieron las especificaciones del fabricante, las cuales se detallan a continuación. La extracción se llevó a cabo a partir de 200 µl de sangre periférica, se agregaron 20 µl de proteinasa K y se mezclaron por

inversión. Se agregaron 200 µl de amortiguador AL y se agitó en vórtex. Se incubaron las muestras a 56 °C durante 10 min. Se agregaron 200 µl de etanol absoluto a TA y se agitó en vórtex. En un tubo nuevo se colocó una columna con filtro DNeasy y se adicionó la muestra colocándola en el centro del filtro. Se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min. Se desechó el sobrenadante y se pasó la columna a un tubo nuevo, agregándole 500 µl de amortiguador AW1, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 min, se desechó el sobrenadante y se conservó la columna. Se realizó el procedimiento anterior adicionando 500 µl de amortiguador AW2. Se centrifugó por 3 min a 14 000 rpm, se desechó el filtrado y finalmente se pasó la columna a otro tubo nuevo para adicionar 200 µl de amortiguador AE. Se incubó durante 1 min a TA para permitir que el DNA se desprendiera de la columna y pudiera ser eluido en la siguiente centrifugación que se realizó a 8000 rpm durante 1 min. Las muestras fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

### Cuantificación de DNA, análisis de integridad y pureza

Se analizó la cantidad y pureza del DNA por nanoespectrofotometría en un nanodrop 2000 de Thermo Fisher ®. Los valores reportados como óptimos en la pureza del DNA son entre 1.7 – 1.9 (Green & Sambrook, 2012).

La integridad fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 10 µg/ml de bromuro de etidio, y fue visualizado en un fotodocumentador Mini-Bis Pro ® (Accesolab), bajo luz ultravioleta (UV). Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb de AXYGEN ®.

### Genotipificación de polimorfismos

Para el análisis de PCR múltiple se amplificaron tres genes polimórficos simultáneamente; los oligonucleótidos *Fwd* gaactccctgaaaagctaaagc, *Rvs* gttgggctcaatacggtgg que amplifican un fragmento de 480 pb que corresponde al gen *GSTT1*; como control interno se utilizaron los oligonucleótidos *Fwd* gaactgccacttcagtcgtct, *Rvs* cagctgcatttggaaagtgtct que amplifican 312 pb del gen *CYP1A1*; y finalmente los oligonucleótidos *Fwd* ttcccttactggctcacatctc, *Rvs* tcacccggatcatggccagca que amplifican un fragmento de 215 pb del gen *GSTM1*. Los oligonucleótidos fueron diseñados en la región polimórfica de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, donde ocurre una delección; los individuos que tienen el polimorfismo en condición homocigota resultan negativos para la reacción de PCR, sin embargo, los heterocigos y los

homólogos silvestres amplifican el mismo fragmento resultando positivos para la reacción (Abdel-Rahman, el-Zein, Anwar & Au, 1996).

Para el análisis de PCR - RFLP se utilizaron los oligonucleótidos *Fwd* ctgtctccctggttacaggaagc y *Rvs* ttccagccgttgcagcaggatgcc que amplifican un fragmento de 204 pb del gen *CYP1A1*. El polimorfismo *CYP1A1 Ile482Val* (rs1048943) fue identificado por la longitud de los fragmentos de restricción utilizando 0.4 unidades de la enzima *BsrDI*, donde el homólogo silvestre genera fragmentos de 149 pb y 55 pb, el heterólogo 204 pb, 149 pb y 55 pb, mientras que el homólogo polimórfico pierde el sitio de restricción y se observa una banda de 204 pb (Cascorbi, Brockmöller & Roots, 1996). La visualización de los fragmentos se realizó después de la electroforesis en gel de agarosa al 3%, posterior tinción con bromuro de etidio 10 µg/ml. Se utilizó el marcador de peso molecular de 50 pb de Invitrogen ®.

En el PCR tiempo real se genotipificó el polimorfismo *AhR Arg554Lys* (rs2066583) del receptor de arílos, utilizando la sonda TaqMan C\_11170747\_20X de *Applied Biosystems* ® siguiendo las recomendaciones del fabricante, en un PCR tiempo real *Step One* de *Applied Biosystems* ®, la asignación de genotipos la realiza el equipo de forma automática según los fluoróforos detectados durante la reacción.

### Secuenciación e identidad de fragmentos amplificados

Se utilizaron los oligonucleótidos *Fwd* ggcaagataactaact-gcaccga, *Rvs* agcttgagttcagagccaagg para amplificar un fragmento de 345 pb del gen *AhR* y los oligonucleótidos antes descritos para obtener los fragmentos de 480 pb, 215 pb y 204 pb correspondientes a los genes *GSTT1*, *GSTM1* y *CYP1A1*, respectivamente, que fueron reamplificados y purificados utilizando el *Kit Purification Product of PCR* ® de Qiagen para su secuenciación, la cual se llevó a cabo en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para verificar la identidad de las secuencias se realizó un análisis *nucleotide blast* con el software *blastn* disponible en la página del *National Center for Biotechnology Information* (2015).

### Análisis estadístico

Se analizaron las medidas de tendencia central (Media ± DE) para los parámetros de pureza y cantidad, posteriormente se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para verificar la normalidad de la distribución y una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis usando el paquete estadístico SPSS V-20.0 para Windows.

## RESULTADOS

Los parámetros más importantes que se deben tomar en cuenta en la extracción del DNA son la pureza, cantidad e integridad. En la pureza, los métodos GS, DNAzol ®, DNeasy ®, GSC y FCI tuvieron valores de  $1.71 \pm 0.11$ ;  $2.52 \pm 0.70$ ;  $1.77 \pm 0.08$ ;  $1.80 \pm 0.04$  y  $1.74 \pm 0.24$ , respectivamente; mientras que en la cantidad expresada en ng/µl se obtuvieron  $136.76 \pm 115.18$ ;  $29 \pm 28.8$ ;  $23.19 \pm 7.42$ ;  $211.93 \pm 103.93$  y  $189.02 \pm 57.87$  para GS, DNAzol ®, DNeasy ®, GSC y FCI, respectivamente (tabla 1). En la comparación entre grupos no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de DNA obtenida por µl ( $p = 0.215$ ), mientras que en la pureza se encontró diferencia en el método DNAzol ® con respecto a los demás ( $p = 0.05$ ).

Adicionalmente, se analizó la cantidad total de DNA extraído y se observó alta variabilidad debido a que los métodos tradicionales recuperan mayor cantidad, hasta 83 µg en el caso de GS, con respecto a los kits comerciales que recuperan alrededor de 6 µg ( $p = 0.03$ ) (figura 1).

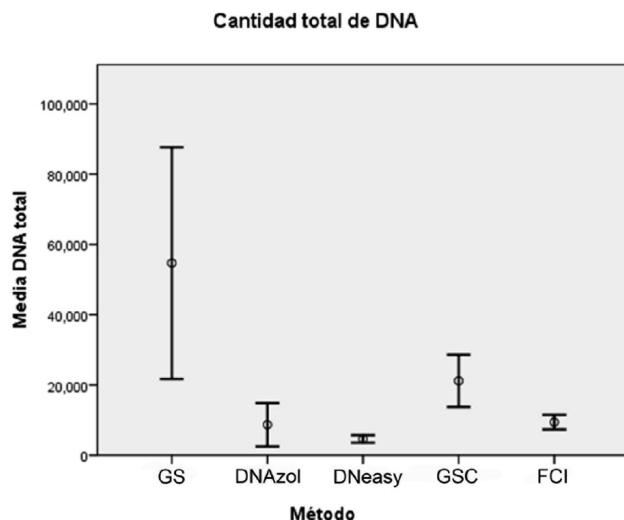
La integridad del DNA se analizó por electroforesis y se observó DNA de elevado peso molecular en todas las muestras aisladas por los diferentes métodos (figura 2).

Para el análisis molecular se seleccionaron cuatro genes que se encuentran ampliamente reportados en distintas poblaciones y cuya genotipificación se ha realizado por diversas metodologías. En el análisis molecular por PCR y la asignación de genotipos se incluyeron todas las muestras purificadas por los distintos métodos de extracción de DNA mencionados, de tal modo que la misma muestra fue purificada por cinco métodos distintos y fue genotipificada para los genes *AhR*, *CYP1A1*, *GSTM1* y *GSTT1* por tres metodologías estándar (figura 3).

**Tabla 1.**  
Parámetros de pureza y cantidad de DNA obtenidos en distintos métodos de extracción.

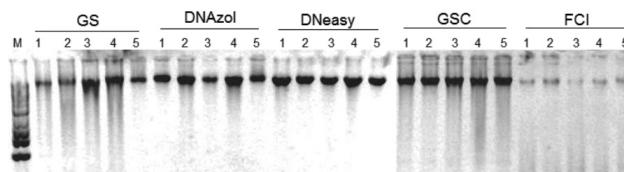
Técnica de extracción de DNA	Pureza Abs. 260/280 nm (Media ± DE)	Concentración de DNA (ng/µl) (Media ± DE)
GS	$1.71 \pm 0.11$	$136.76 \pm 115.18$
DNAzol	$2.52 \pm 0.70$	$29.00 \pm 28.80$
DNeasy	$1.77 \pm 0.08$	$23.19 \pm 7.42$
GSC	$1.80 \pm 0.04$	$211.93 \pm 103.93$
FCI	$1.74 \pm 0.24$	$189.02 \pm 57.87$
Valor <i>p</i>	0.04*	0.21

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 1.** El método GS recupera  $54.6 \mu\text{g} \pm 46.0$ , DNAzol  $8.7 \mu\text{g} \pm 8.6$ , DNeasy  $4.6 \mu\text{g} \pm 1.48$ , GSC  $21.1 \mu\text{g} \pm 10.3$  y FCI  $9.4 \mu\text{g} \pm 2.8$  ( $p=0.03$ ).

Fuente: Elaboración propia.

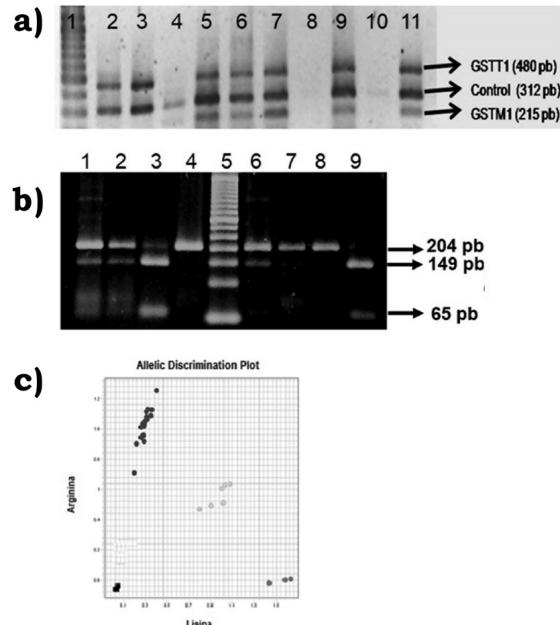


**Figura 2.** Gel de integridad de DNA. Se muestran cinco muestras representativas, purificadas por los diferentes métodos. Para visualizar bien las bandas se cargaron  $\sim 200$ - $250$  ng de DNA por carril, de las muestras de GS, FCI y GSC se cargaron de  $1$ - $2$   $\mu\text{L}$ , mientras que de DNAzol se cargaron  $10$ - $20$   $\mu\text{L}$  y de DNeasy de  $10$ - $15$   $\mu\text{L}$ .

Fuente: Elaboración propia.

Para validar los resultados anteriores, se secuenciaron las muestras homocigotas para ambos alelos de cada polimorfismo; en el caso de *GSTM1* y *GSTT1* se secuenciaron muestras positivas para ambos genes y se realizó un análisis *nblast* que confirmó la identidad de las secuencias. En la figura 4 se observan los cambios de un solo nucleótido en el gen *AhR Arg554Lys* (rs2066583) y *CYP1A1 Ile482Val* (rs1048943).

En la genotipificación de *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* por PCR múltiple se observó que las muestras purificadas por el método de GS y GSC tuvieron una eficiencia de amplificación del 100% y una concordancia también del 100%; es decir, el resultado fue reproducible y la muestra presentó el mismo genotipo, independientemente del método de extracción. En el caso de las muestras purificadas por DNAzol ® y DNeasy ® se observó una



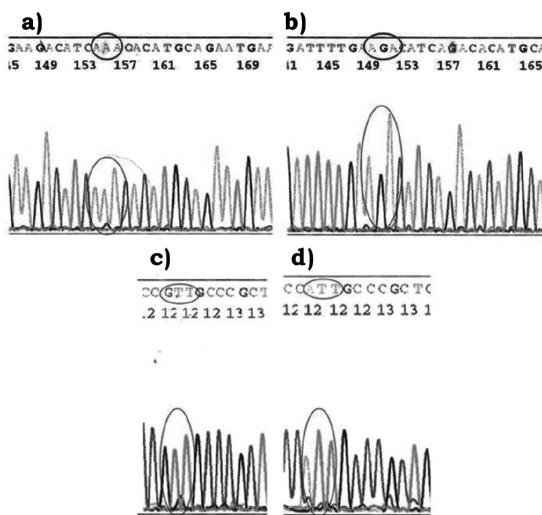
**Figura 3.** Métodos de genotipificación por PCR. A) PCR múltiple para las delecciones en los genes *GSTM1* y *GSTT1*. a) Las muestras de los carriles 5, 6, 7 9 y 11 son positivos para ambos genes, las muestras de los carriles 2 y 3 son positivas para *GSTT1*, la muestra del carril 4 es negativa para ambos genes y las muestras de los carriles 8 y 10 no amplificaron, tampoco amplificó el control interno. b) PCR-RFLP's del polimorfismo *CYP1A1 Ile462Val*. Las muestras de los carriles 1, 2, 3 y 6 son heterocigas con genotipo Ile/Val, las muestras del carril 7 y 8 son homocigas Val/Val y la muestra del carril 9 es homocigota Ile/Ile, el control negativo se observa en el carril 4. c) PCR tiempo real para la genotipificación del polimorfismo *AhR Arg554Lys*. Las muestras en el eje X corresponden a homocigos Lys/Lys, las muestras en el eje Y corresponden a homocigos Arg/Arg, mientras que los intermedios corresponden a los heterocigos Arg/Lys, la asignación de genotipos es automática, según el fluoróforo detectado durante la reacción.

Fuente: Elaboración propia.

eficiencia de amplificación del 80% y una concordancia del 100%, mientras que las muestras purificadas por el método FCI no amplificaron, incluso después de tres intentos (tabla 2).

En la genotipificación de *CYP1A1 Ile462Val* por PCR-RFLP's se obtuvo una eficiencia de amplificación del 100% en los métodos GS, GSC, del 80% para DNAzol y DNeasy y de 0% en el método FCI. Sin embargo, la concordancia fue del 100% entre los métodos GS y GSC, del 80% en el método DNeasy ® y del 50% con DNAzol ®.

Finalmente, en la genotipificación de *AhR Arg554Lys* por PCR tiempo real se obtuvo una eficiencia de amplificación del 100% en todas las muestras y una concordancia del 100% entre los distintos métodos (tabla 2).



**Figura 4.** Secuencias del gen *AhR* Arg554Lys. a) Triplete que codifica para el aminoácido lisina (AAA) y b) Triplete que codifica para el aminoácido arginina (AGA). Secuencias del gen *CYP1A1* lle482Val. c) Triplete que codifica para el alelo valina (GTT) y d) Triplete que codifica para el alelo isoleucina ATT).

Fuente: Elaboración propia.

## DISCUSIÓN

La calidad del DNA purificado es un punto clave en la aplicación de diversas técnicas moleculares. Los principales parámetros analizados después de una extracción son la pureza, la cantidad y la integridad. Se evaluaron tres métodos tradicionales de extracción de DNA y dos métodos comerciales, así como su eficiencia de amplificación y concordancia para genotipificar polimorfismos en los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP1A1* y *AhR*, que son de gran interés toxicológico.

Una técnica de extracción ideal es aquella que posee un número limitado de pasos, mínima utilización de disolventes peligrosos, requerimiento limitado de

equipos y que sea relativamente económica (Osorio-Cadavid, Ramírez, López & Mambusgay, 2009). La técnica de FCl requiere fenol que es un disolvente tóxico e irritante, además puede causar quemaduras graves en la piel y serias lesiones oculares. Adicionalmente, el cloroformo ha sido descrito como potencial carcinógeno humano capaz de causar la muerte si no es usado de manera adecuada; todas estas características pueden afectar la salud de la persona que manipula las muestras durante el proceso de extracción.

En contraste, las técnicas de extracción por sales y sacarosa utilizan reactivos inocuos como sacarosa, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, EDTA y Tris-HCl; aunque no se han reportado casos de toxicidad grave, el SDS es clasificado como un compuesto moderadamente tóxico en concentraciones superiores a 1000 mg/Kg. En el método GS se requiere este reactivo a una concentración del 10%, que no representa un riesgo grave a la salud. Por su parte, el NaClO<sub>4</sub> es empleado en el método gradiente de sacarosa a una concentración de 5 M; este reactivo es clasificado como una sal oxidante fuerte que puede provocar incendios o explosiones al no ser utilizado adecuadamente; mientras que los kits comerciales son seguros y reproducibles, aunque en el caso de DNAzol ® no se obtuvieron buenos resultados; no obstante, estos reactivos tienen costos elevados, lo que podrían ser una limitante en la ejecución de un proyecto que involucra el análisis de un alto número de muestras.

La pureza del DNA extraído se encontró dentro de los rangos establecidos como óptimos (1.7 – 1.9), a excepción de las muestras purificadas con DNAzol ® que mostraron valores de hasta 2.5. Estos valores no se consideran confiables, pues en este caso puede haber contaminación con proteínas y/o disolventes que pudieran interferir en la reacción de PCR, como se ha documentado (Green & Sambrook, 2012).

**Tabla 2.**

Porcentaje de la eficiencia de amplificación y concordancia entre genotipos de *GSTM1*\*0, *GSTT1*\*0, *CYP1A1* lle462Val y *AhR* Arg554Lys.

<b>Técnica</b>	<b>PCR múltiple punto final</b>		<b>PCR-RFLP</b>		<b>PCR tiempo real</b>	
	<b>% Amplificación</b>	<b>Concordancia<sup>a</sup></b>	<b>% Amplificación</b>	<b>Concordancia<sup>a</sup></b>	<b>% Amplificación</b>	<b>Concordancia<sup>a</sup></b>
GS	100	100	100	100	100	100
GSC	100	100	100	100	100	100
FCl	0	NA <sup>b</sup>	0	NA <sup>b</sup>	100	100
DNAzol	80	100	100	50	100	100
DNeasy	80	100	80	80	100	100

<sup>a</sup> Se consideró concordancia cuando el resultado fue reproducible y la muestra presentó el mismo genotipo, independientemente del método de extracción; <sup>b</sup> NA: no aplica.  
Fuente: Elaboración propia.

En la cantidad de DNA extraído se obtuvieron concentraciones desde 8.5 ng/ $\mu$ l de DNA en los kits comerciales hasta 393.20 ng/ $\mu$ l en el método GS, sin embargo, las diferencias no fueron significativas debido a la alta variabilidad entre los métodos; aunque en el caso de DNeasy ® se observaron desviaciones muy pequeñas, como es esperado en un método comercial que debe ser reproducible.

En cuanto a la cantidad total, Caboux *et al.* (2012) reportaron que, utilizando la técnica de extracción adecuada, es posible obtener hasta 300% más material genético, alcanzando un rendimiento de hasta 45  $\mu$ g de DNA total, partiendo de 1 ml de muestra sanguínea. En este estudio, el método que recuperó mayor cantidad de DNA fue el método GS ( $\mu = 54.6 \pm 46.0$   $\mu$ g). A este respecto, en algunas investigaciones es muy importante obtener la mayor cantidad de muestra, por ejemplo, para la creación de bancos genómicos es necesario resguardar una cantidad adecuada de material y una mínima contaminación con proteínas y sales o disolventes. Por otro lado, los aductos en el DNA son un marcador de efecto ante la exposición a diversos tóxicos, para su determinación se requieren cantidades de DNA en el orden de los  $\mu$ g, por lo que la extracción debe ser muy eficiente (Monien *et al.*, 2014); en estos casos las técnicas de extracción por GS y GSC ofrecen esta ventaja.

Por otro lado, los estudios de epidemiología molecular y farmacogenómica analizan la frecuencia de ciertos genotipos en diversas poblaciones, con la finalidad de establecer asociaciones entre la exposición a xenobióticos, la capacidad metabólica, la presencia de biomarcadores de efecto y el desarrollo de ciertas patologías, sin embargo, los resultados son inconsistentes en la mayoría de los casos; la falta de reproducibilidad puede ser atribuida al método de extracción de DNA y/o a la técnica utilizada para la genotipificación. A este respecto, el proyecto internacional HapMap ha sugerido estandarizar las técnicas para que los resultados puedan ser comparables y confiables, de tal modo que podría haber consistencia de resultados entre poblaciones, ya que actualmente estas diferencias pueden ser debidas a errores metodológicos (Garte, 1998; International HapMap Project, 2015).

Los genes AhR, CYP1A1, GSTM1 y GSTT1 han sido genotipificados en poblaciones caucásicas, asiáticas, africanas y en poblaciones con diversos grados de mestizaje (Dong *et al.*, 2008; He *et al.*, 2014; Pérez-Morales *et al.*, 2014). Las frecuencias reportadas son muy variables y los estudios de asociación, principal-

mente con cáncer, son inconsistentes. No obstante, los estudios realizados en países desarrollados se llevan a cabo por análisis de fusión a alta resolución (*high resolution melting analysis [HRM]*), discriminación alélica con sondas TaqMan ®, PCR alelo específico (AS-PCR) y pirosecuenciación (Gaedigk *et al.*, 2015; Zhang, Zhao, Cui, Wang & Wang, 2015); estos métodos tienen alta reproducibilidad en cualquier tipo de muestra de DNA, aunque son muy costosos y requieren infraestructura de vanguardia, por lo que en los países poco desarrollados el acceso a esta tecnología está limitada, siendo necesario analizar los resultados obtenidos con las técnicas tradicionales, menos costosas y compararlas con el estándar de oro.

En la genotipificación de *GSTM1\*0* y *GSTT1\*0* por PCR múltiple se observó una concordancia del 100% entre los resultados obtenidos por los métodos GS, GSC, DNAzol ® y DNeasy ®, mientras que las muestras purificadas por el método FCI no amplificaron, posiblemente debido a que el fenol o el cloroformo inhiben la PCR, como se ha reportado previamente por otros autores (Thompson, Duncan & McCord, 2014).

En la genotipificación de *CYP1A1 Ile462Val* por PCR – PFLP's se obtuvo una concordancia del 100% entre los métodos GS y GSC, del 80% en el método DNeasy ® y del 50% con DNAzol ®; es posible que la baja cantidad de DNA obtenida mediante DNeasy ® pueda producir un bajo número de copias del amplíon y esto interfiera con el análisis de restricción; en el caso de DNAzol ® la eficiencia de amplificación fue del 100% y la concordancia del 50%, debido posiblemente a que la contaminación residual, reflejada en los valores 260/280 nm, no actúe como inhibidor de la polimerasa, pero sí como inhibidor de las enzimas de restricción, ya que se observaron digestiones parciales.

Finalmente, en la genotipificación de *AhR Arg554Lys* por PCR tiempo real se obtuvo una eficiencia de amplificación del 100% en todas las muestras y una concordancia del 100% entre métodos, lo que demuestra que esta metodología es muy sensible, aun en muestras que no son amplificadas por el PCR punto final (debido a la presencia de posibles contaminaciones); además de que utiliza cantidades de DNA muy pequeñas, incluso de 5 ng – 50 ng por reacción. Los estudios reportados por Zhang *et al.* (2015) y Gaedigk *et al.* (2015) comprobaron que la genotipificación con sondas TaqMan ® es muy sensible y confiable, incluso en locus altamente polimórficos como el *CYP2D6*, además de ser tan eficiente como otras metodologías más

sofisticadas, entre ellas la pirosecuenciación, HRM y AS-PCR, con la ventaja de tener un costo más bajo que las técnicas antes mencionadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la importancia de elegir un método de extracción de DNA adecuado y considerar su impacto en la tipificación de genotipos, ya que las bases metodológicas de estas técnicas son extendidas al diagnóstico molecular, y al no ser considerados estos factores los resultados pueden resultar erróneos.

## CONCLUSIONES

Los métodos de extracción por GS y GSC tuvieron los mejores resultados en pureza y cantidad. Las muestras amplificaron en todas las variantes de PCR. La genotipificación por medio de sondas TaqMan® mostró una eficiencia de amplificación y genotipificación del 100%, independientemente del método de extracción.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado con recursos otorgados por el Programa Institucional de Fortalecimiento a la Infraestructura al CA-UJED-108 (2012-2013), de la Facultad de Ciencias Químicas (Gómez Palacio) de la Universidad Juárez del Estado de Durango, por tal motivo se extiende un agradecimiento. Asimismo, se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por otorgar una beca para estudios de posgrado a Efraín Ríos-Sánchez, con registro CVU 634591.

## REFERENCES

- Abdel-Rahman, S. Z., el-Zein, R. A., Anwar, W. A., & Au, W. W. (1996). A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters*, 107(2), 229-233.
- Baena, J. A., Ramos, A. J., Gómez, C. J., & Gómez, D. E. (2013). Comparación de métodos de extracción de ADN en tejidos parafinados y utilidad para amplificación por PCR. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 172-179.
- Blanco-Jarvio, A., Martínez, L. A., & Bautista, G. A. (2014). Optimización de un protocolo de extracción de DNA total para la amplificación de marcadores moleculares funcionales específicos de organismos desnitrificantes. *CICIMAR Océánides*, 29(2), 37-44.
- Caboux, E., Lallemand, C., Ferro, G., Hemon, B., Mandy, M., & Biessy, C. (2012). Sources of pre-analytical variations in yield of DNA extracted from blood samples: Analysis of 50 000 DNA samples in EPIC. *PLoS One*, 7(7), e39821-e39821.
- Castorbi, I., Brockmöller, J., & Roots, I. (1996). A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Research*, 56(21), 4965-4969.
- Daly, A., Steen, V., Fairbrother, K., & Idle, J. (1996). CYP2D6 multiallelism. *Methods in Enzymology*, 272, 199-201.
- Dong, L., Potter, J., White, E., Ulrich, C., Cardon, L., & Peters, U. (2008). Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphism in candidate genes. *The Journal of the American Medical Association*, 299(20), 2423-2434.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología molecular*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) / Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (Conabio).
- Gaedigk, A., Freeman, N., Hartshorne, T., Riffel, A. K., Irwin, D., Bishop, J. R., Stein, M. A., Newcorn, J. F., Montané, L. K., Cherner, M., & Leedert, J. S. (2015). SNP genotyping using TaqMan® technology: the CYP2D6\*17 assay conundrum. *Scientific Reports*, 19(5), 1-9.
- Garte, S. (1998). The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphism: the example of CYP1A1. *Carcinogenesis*, 19(8), 1329-1323.
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning. A laboratory manual* (4th ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- He, H. R., You, H. S., Sun, J. Y., Hu, S. S., Ma, Y., Dong, Y. L., & Lu, J. (2014). Glutathione S-transferase gene polymorphisms and susceptibility to acute myeloid leukemia: meta-analyses. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 44(11), 1070-1081.
- International HapMap Project (2015). Recuperado el 20 de abril de 2015 de <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, 19(19), 5444.
- Monien, B. H., Schumacher, F., Herrmann, K., Glatt, H., Turesky, R. J., & Chesne, C. (2014). Simultaneous detection of multiple DNA adducts in human lung samples by Isotope-Dilution UPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 87(1), 641-648.
- National Center for Biotechnology Information (2015). *Basic Local Alignment Search*. Recuperado el 5 de junio de 2015 de <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Osorio-Cadavid, E., Ramírez, M., López, W. A., & Mambuscas, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 125-131.
- Pérez-Morales, R., Méndez-Ramírez, I., Moreno-Macías, H., Mendoza-Posadas, A. D., Martínez-Ramírez, O. C., Castro-Hernández, C., Gonsebatt, M. E., & Rubio, J. (2014). Genetic susceptibility to lung cancer based on candidate genes in a sample from the Mexican Mestizo population: A case-control study. *Lung*, 192(1), 167-73.

- Saitou, M., & Ishida, T. (2015). Distributions of the GSTM1 and GSTT1 null genotypes worldwide are characterized by latitudinal clines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(1), 355-361.
- Spink, B. C., Bloom, M. S., Wu, S., Sell, S., Schneider, E., Ding, X., & Spink, D. C. (2014). Analysis of the AHR gene proximal promoter GGGGC-repeat polymorphism in lung, breast, and colon cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282(1), 30-41.
- Thompson, R. E., Duncan, G., & McCord, B. R. (2014). An investigation of PCR inhibition using Plexor®-Based Quantitative PCR and Short Tandem Repeat Amplification. *Journal of Forensic Sciences*, 59(6), 1517-1529.
- Zhang, L., Zhao, J., Cui, G., Wang, H., & Wang, D. W. (2015). Genotyping on ALDH2: Comparison of four different technologies. *PLoS One*, 10(3), e0122745-e0122754.

# Toxicology Letters

*An International Journal for the Rapid Publication of Short Reports on all Aspects of  
Toxicology Especially Mechanisms of Toxicity*

**Managing Editor for the Americas**  
J.P. Kehler, Pullman, WA, USA

**Managing Editor for Europe, Africa, Australasia and Asia**  
W. Dekant, Würzburg, Germany

**Managing Editor for China and India**  
Y. Li, Blacksburg, VA, USA

**Associate Editor**  
C.V. Smith, Seattle, WA, USA

**Reviews Editor**  
M. I. Panagiotidis, Reno, NV, USA

**Honorary Founding Editor**  
D.B. Menzel, Irvine, CA, USA



# Toxicology Letters

*An International Journal for the Rapid Publication of Short Reports on all Aspects of  
Toxicology Especially Mechanisms of Toxicity*

**Volume 259S (2016)**

XIV International Congress of Toxicology

## PP26.15

## Red dye 40 degradation by enterobacteria of the intestinal microbiota



E. Chávez<sup>1</sup>, A.J.A. Alonso<sup>2</sup>, E. Castañeda<sup>3</sup>, A.L. Sánchez<sup>2</sup>, G. Salazar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CICM – ICUAP, Puebla, Puebla, Mexico

<sup>2</sup> FQ-BUAP, Puebla, Puebla, Mexico

<sup>3</sup> Tecnológico de Monterrey Campus, Puebla, Puebla, Mexico

**Introduction:** Azo dyes such as red 40 are characterized by an R<sub>1</sub>-N=N-R<sub>2</sub> structure and are widely used in the food industry, but their anaerobic degradation in the gut microbiota by azoreductases originate toxic or mutagenic aromatic amines, so their use has been restricted in many countries.

**Objective:** Submit the red dye 40 to degradation by enterobacteria and partially characterize the products of its anaerobic reduction.

**Methods:** Two enterobacter isolated from an infant together with the reference strains *Escherichia coli* DH5α, *Escherichia coli* E2348/69, *Citrobacter rodentium* DBS13, and *Enterobacter cloacae* were used to inoculate 30 ppm of red dye 40 samples. The degradation percentage was estimated by UV/vis spectroscopy and the products of anaerobic reduction were characterized by HPLC using a stationary phase of PS/DVB, mobile phase of 5 mM sulfuric acid and a flow rate of 0.650 mL/min.

**Results:** The isolates from the infant fecal sample were identified as *Enterobacter* sp. and *Escherichia coli* and the inoculation test of these bacteria in red dye 40 yielded a degradation of 60% and 49% respectively. Regarding reference strains, the degradation percentages were as follows: *Escherichia coli* DH5α 83.2%, *Citrobacter rodentium* DBS13 82%, *Escherichia coli* E2348/69 75.7% and *Enterobacter cloacae* 65%. The HPLC results showed that the degradation products of red dye 40 by all the bacteria except the gut microflora *Escherichia coli* had a retention time very similar to the control 1-naphthol when using wavelengths of 285 and 315 nm. When comparing all of them with aniline, they all showed a similar retention time using wavelengths of 260 and 285 nm.

**Conclusion:** Degradation of a red dye 40 solution by different types of bacteria used in this research revealed a formation of analogous compounds to 1-naphthol and aromatic amines. Aromatic amines may cause urinary tract cancer, especially in bladder, and they may increase risk for acute intoxication leading to methemoglobinemia. Since studies in rats had shown that 1-naphthol causes heavy breathing, squinting eyelids, runny nose and diarrhea, it is important to limit this food colorant consumption due to health risks.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.750>

## PP26.16

## Lung inflammation and toxicological assessment in A/J mice in response to chronic exposure to mainstream aerosol from candidate modified risk tobacco product and smoke from conventional cigarettes



E.T. Wong<sup>1</sup>, K. Luettich<sup>2</sup>, K. Trivedi<sup>2</sup>, E. Guedj<sup>2</sup>, Y. Xiang<sup>2</sup>, A. Elamin<sup>2</sup>, E. Veljkovic<sup>1</sup>, A.W. Hayes, P. Leroy<sup>2</sup>, P. Vanschaeuwijck<sup>2</sup>, M. Peitsch<sup>2</sup>, J. Hoeng<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Philip Morris International Research Laboratories, Singapore

<sup>2</sup> Philip Morris International, Products S.A., Switzerland

Chronic exposure to cigarette smoke is the leading cause of lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease. The A/J mouse model is used to evaluate lung inflammation, lung cancer development, toxicological impact and the underlying molecular changes upon life-time exposure to cigarette smoke (CS) from a reference cigarette 3R4F or to aerosol from the Tobacco Heating System (THS) 2.2, a candidate modified risk tobacco product (cMRTP).

A/J mice were exposed for 6 hours per day for 5 days per week with planned total exposure duration of 18 months. Quantification of pulmonary inflammation, lung function tests, histopathological evaluation, toxicological assessment as well as transcriptome and proteome analysis of respiratory tract organs were performed at interim dissections. Exposure to CS induced changes in red blood cell profiles that are consistent with high carbon monoxide in CS smoke but were not observed following THS2.2 aerosol exposure.

Exposure to CS also resulted in pulmonary inflammation, altered lung function and molecular changes that are suggestive of emphysema but only minimal effects were observed following THS2.2 aerosol exposure. Significant changes in the airway transcriptome and proteome were observed following CS exposure, but only few genes and proteins were altered following THS2.2 aerosol exposure. Biological network analysis identified perturbed molecular processes that are consistent with CS exposure, but only minor perturbations of cell stress responses were noted following THS2.2 aerosol exposure.

In summary, lung inflammation and the associated loss of pulmonary function and molecular perturbations were significantly reduced in mice exposed to aerosol from THS2.2 as compared to CS exposure.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.723>

## PP26.17

## Hematological and metabolic alterations induced by acute poisoning with nitrates in Wistar rats



M.F. González-Delgado<sup>1</sup>, V. Hernández-Sifuentes<sup>1</sup>, E.Y. Calleros-Rincón<sup>1</sup>, M.E. Gonsebatt<sup>2</sup>, R. Pérez-Morales<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango, México

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

**Introduction:** Nitrate pollution is caused by over-fertilization of soil and inadequate management of industrial and domestic wastewater. Nitrates are reduced to nitrite inside the body and they promote the transformation of hemoglobin to metaHb and

variants associated with the health effects caused by fluoride, were taken. Amplification by PCR was performed for COL1A2 gene. The diagnosis of dental fluorosis was performed by clinical examination using Thylstrup-Fejerskov index.

**Results:** The results showed an average concentration of fluoride in drinking water of 4.54 mg/L, an average exposure level of 3.14 mg/L, the prevalence of dental fluorosis of 100% and a prevalence of polymorphism in the COL1A2 gene of 47.5% in the population.

**Conclusions:** The level of contamination is very high fluoride, dental fluorosis in the population is a serious public health and the presence of the polymorphism in the COL1A2 gene associated with the health effects of fluoride is an important finding in the Mexican population. More studies are needed to confirm the association of the polymorphism with dental fluorosis and to evaluate the health impact that the presence of the polymorphism causes.

**Financial support:** Fondo sectorial SS/IMSS/ISSTE y CONACYT.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.317>

#### PP9.14

Alteration in biochemical parameters and genotoxic damage in population exposed to nitrates in drinking water



D.D. Gendarilla-Esparza, R. Pérez-Morales, C. Fraire-Galindo, S. Nieto-González, E.Y. Calleros-Rincón

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Gómez Palacio, Durango, Mexico

**Introduction:** The environmental degradation caused by the inadequate managing of wastewater, manure, excessive use of fertilizers and pesticides have increased the levels of nitrate in drinking water. Ingested nitrate is reduced to nitrite promoting the formation of methemoglobin, as alterations at biochemical parameters as levels of glucose, cholesterol and triglycerides. Through the metabolism of nitrate reactive species that can damage DNA and proteins are generated, or even disrupt the operation of target organs.

**Objective:** Analyze the alterations in biochemical parameters and the genotoxic damage in a population exposed to nitrates in drinking water.

**Materials and methods:** 148 volunteers (5 males and 143 females, age range 18–45 years) that are exposed to 12.5 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> in drinking water. All volunteers had been living in Lerdo, Durango, Mexico for more than 1 year and shared similar dietary habits. Levels of NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> in plasma, methemoglobin percentage and biochemical parameters were determined by spectrophotometry. Genotoxic damage was determined by the cytokinesis-block micronucleus method. All individuals gave informed consent to participate in this study.

**Results:** Exposure to nitrate increases the percentage of methemoglobin (2.6%) and was positively correlated with levels of NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> in plasma ( $r^2 = 0.20$ ,  $p = 0.01$ ). The biochemical parameters levels of glucose, cholesterol and triglycerides exceed reference levels (around of 35%). In genotoxic damage, the frequency of micronucleus was increased (39%); nuclear buds and nucleoplasmic bridges to (~23%), all these values are out of the ranges reference.

**Conclusions:** This study suggests an association between the intake of high concentrations of nitrates and the alterations in biochemical parameters and genotoxic damage.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.318>

#### PP9.15

Effects of glutamine, caffeine and interferon-gamma on mercury compounds-induced SH-SY5Y cytotoxicity



A.B. Engin<sup>1</sup>, E.D. Engin<sup>2</sup>, A.M. Tsatsakis<sup>3,4</sup>, K. Golokhvast<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Toxicology, Hipodrom, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Ankara University, Biotechnology Institute, Tandoğan, Ankara, Turkey

<sup>3</sup> Center of Toxicology Science & Research, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

<sup>4</sup> Scientific Educational Center of Nanotechnology, Far Eastern Federal University, Engineering School, Vladivostok, Russia

**Introduction:** Mercury is a widespread environmental contaminant and well-known to be a neurotoxin. In particular, dopaminergic neurons are more susceptible to mercury compounds-induced cytotoxicity due to high amounts of uptake and accumulation in brain. The increased concentrations of mercury compounds in the brain accuse to contribute to the glutamate dyshomeostasis and oxidative stress. However, the exact mechanism remains to be elucidated.

**Objectives:** The modulation of glutamate signal-transmission through the NMDA or AMPA receptors via caffeine and interferon-gamma on inorganic and organic mercury induced cell death were evaluated.

**Materials and methods:** SH-SY5Y neuroblastoma cells were exposed to 1–5 μM of mercury chloride and methylmercury at 24 and 48 h period in the absence or presence of glutamate and/or interferon-gamma. Additionally, mercury exposed cells were incubated with 10–50 μM caffeine. The mitochondrial metabolic activity was determined by MTT assay, while the cells were counted after treatment with trypan blue dye. Nitric oxide levels were measured spectrophotometrically.

**Results:** In the glutamine-free medium, mercury-induced oxidative stress was not significantly altered in neither first nor second 24 h, whereas toxic effects of mercury compounds were significantly increased in L-glutamine containing medium especially during the second cell cycle. More importantly, we demonstrated that caffeine substantially inhibited mercury-induced oxidative stress. IFN-gamma addition to microglia-free culture resulted in decreased SH-SY5Y cells survival and increased oxidative stress.

**Conclusions:** These data suggest that mercury-induced neuronal death is dependent on glutamate-mediated excitotoxicity. Adenosine receptors blockage by caffeine equivalent doses of daily coffee consumption may reduce the vulnerability to mercury-induced oxidative stress. IFN-gamma addition to microglia-free culture resulted in decreased SH-SY5Y cells survival and increased oxidative stress.

**Financial support:** Supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey, 214S112.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.319>

II CONGRESO INTERNACIONAL, XI CONGRESO NACIONAL SOBRE  
RECURSOS BIÓTICOS DE ZONAS ÁRIDAS

VI CONGRESO NACIONAL y XVI CONGRESO ESTUDIANTIL DE  
MICROBIOLOGÍA PECUARIA

(MEMORIA: Resúmenes y artículos en extenso)

COMPILACIÓN

Miguel Ángel Mata Espinosa, Ricardo Trejo Calzada, Dr. Luis Alberto Miranda Romero

REVISIÓN TÉCNICA

Fabián García González, Aurelio Pedroza Sandoval, Marco Andrés López Santiago, Miguel Ángel Mata Espinosa, Ricardo Trejo Calzada, Sigifredo Armendáriz Erives, Jorge Alberto Ortiz Salazar, Oscar Esquivel Arriaga, José Luis Ortega Sánchez, Rafael Carrillo Flores, Armando López Santos, José Ramón Hernández Salgado, José Ruiz Torres, Gabriel García Herrera, Manuel de Jesús Azpilcueta Ruiz Esparza, Fabián Rosales Noriega, Juan Germán Acosta Gutiérrez, Rolando Santillán Elizarrarás.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

URUZA

Realizado los días 29 y 30 de Octubre del año 2015

# CONTENIDO

## Conferencias Orales

Manejo Integral del Agua		
Titulo	No. Pág.	
Poblaciones rurales contaminadas por nitratos y los riesgos a la salud. Esperanza Yasmin Calleros Rincón.	17	✓
Técnicas de captación y almacenamiento de agua de lluvia para el desarrollo de capacidades en comunidades marginadas de zonas áridas. Aurelio Pedroza Sandoval.	24	
Situación actual de la ganadería: Crecimiento económico de los sistemas de producción bovino lechero en el Estado de Sonora. José Luis Ríos Flores.	25	
Reactores combinados: Anaerobio de flujo ascendente y con inyección de aire para el tratamiento de aguas residuales pecuarias. Aurelio Maldonado Cabrera.	32	
Manejo integral del agua de riego al utilizar fuentes alternas de abastecimiento con variaciones estacionales de metales pesados y metaloides. Miguel Palomo Rodríguez.	33	
Productividad del agua en el cultivo de café Del DDR 021, Villaflor, Chiapas, Producido en Temporal. José Luis Ríos Flores.	40	
Economía de los Recursos Naturales		
Titulo	No. Pág.	
Productividad del agua en el cultivo de manzana ( <i>Malus Domestica</i> ) de Canatlán, Durango, México. José Luis Ríos Flores.	50	
Autogestión del uso eficiente del agua de riego por aplicación de productos orgánicos en la producción de manzana, frijol y maíz amarillo en la zona de la Laguna de Santiago. Juan Manuel Vigueras Cortés.	59	
Productividad del agua en café producido bajo condiciones de temporal en Motozintla, Chiapas, México. Cayetano Navarrete Molina.	60	
Estudio etnobotánico de Orégano ( <i>Lippia berlandieri</i> ) en el Ejido la Trinidad	68	

## Calidad del agua en la Región Lagunera

Gandarilla-Esparza, Diana Dennys<sup>1</sup>, Pérez-Morales, Rebeca<sup>1</sup>, \*Calleros-Rincón, Esperanza Yasmin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Juárez del estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas,

Departamento de investigación y posgrado.

\* [dra.ecallerosrincon@ujed.mx](mailto:dra.ecallerosrincon@ujed.mx)

### RESUMEN

Los contaminantes en el agua han estado presentes durante años, siendo microorganismos, metales, etc., en estos últimos años se ha obtenido mayor información referente a estos contaminantes gracias a la investigación. El impacto que tiene la distribución, cantidad y calidad del agua, en relación con el suelo y los cultivos de una porción ha tenido una influencia en la salud. Las diversas actividades que se realicen cerca de los pozos de agua o de las fuentes de agua potable afectan la calidad del agua y si no se tiene un buen monitoreo de calidad se llega a afectar la salud humana y ganadera.

**Palabras clave:** metales, microorganismos, agua.

### ABSTRACT

The pollutants in the water have been present for years, being microorganisms, metals, etc., in the latter years there has been obtained major information relating to these pollutants thanks to the research. The impact that has the distribution, quantity and quality of the water, in relation with the soil and the culturing of a portion has had an influence in the health. The diverse activities that are realized near the water wells or the drinking fountains affect the quality of the water and if a good monitoring of quality is not had it manages to affect the human and cattle health.

**Key words:** metals, microorganisms, water.

### INTRODUCCION

La contaminación de agua potable puede ser resultado de la actividad natural o artificial. Las fuentes de contaminación de agua potable pueden ser clasificadas como fuentes de punto o fuentes de no punto. La contaminación de la fuente se refiere a la contaminación descargada de un transporte perceptible, limitado, discreto como un tubo, el contenedor, o el navío.

El agua potable puede ser obtenida de redes fluviales públicas o una fuente no pública como directo de pozo. El agua de pozo típicamente no es probada tan a menudo como el agua del público de redes fluviales. La seguridad de agua potable en las fuentes privadas, necesita con regularidad pruebas para descubrir algún contaminante que potencialmente podría afectar la calidad de agua.

Las pruebas para ciertos contaminantes deberían ser realizadas cada año o cada 6 meses, dependiendo de los resultados obtenidos. También aconsejan a las pruebas regulares de agua potable privada; para muchos tipos de contaminantes (microorganismos, metales, nitratos, radón,

**Conclusion.** The values were higher than allowed value although not all wells are for human consumption, the population also consumes water from agricultural wells.

**Keywords.** Pollution, water, nitrates, health.

## INTRODUCCIÓN

Los nitratos son uno de los contaminantes del agua potable, producidos en parte por la excesiva fertilización de los campos y la falta de gestión ambiental del estiércol generado por los hatos ganaderos. La Comarca Lagunera, se considera actualmente la cuenca lechera más importante de nuestro país la cual abastece a su vez la demanda de alimento forrajero para el ganado y de hortalizas para consumo humano, (Cueto Wong, 2005). Para mejorar los cultivos, se han utilizado de forma no controlada fertilizantes ricos en nitratos contribuyendo con ello a la acumulación de grandes cantidades de nitratos en los campos. Esto aunado al hecho de que el ganado vacuno produce grandes cantidades de estiércol rico en compuestos de nitrógeno que pueden percolar hacia el acuífero, generando que en algunas comunidades el agua de abastecimiento humano tenga cantidades de nitratos por arriba de los límites recomendados para su consumo. (Perdomo, 2001). Una de las principales reservas de agua para la Comarca Lagunera la constituye el acuífero de ciudad Juárez, Durango, que actualmente abastece a diferentes ejidos en donde la concentración de nitratos se encuentra entre 0 a 124 mg/L (CNA Torreón. Coah, 2001-2006; Cueto Wong, 2005). El agua para consumo humano debe cumplir con diferentes criterios de calidad, los cuales están establecidos en la Norma Oficial Mexicana 127- SSA, 1994; (NOM 127, SSA, en dicha norma se menciona que el nivel máximo permisible respecto al contenido de nitratos es de 10 mg/L expresados como nitrógeno de nitrato. La EPA, (Environmental Protection Agency), considera también la misma concentración (10 N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mg/L), mientras que la Organización Mundial de la Salud marca como nivel máximo el de 50mg/L como nitrato. En años recientes se han presentado a nivel mundial problemas de contaminación del agua subterránea, con una amplia variedad de contaminantes proveniente de fuentes puntuales y dispersas. (EPA, 2003) son varios los efectos adversos que tienen el consumo de agua contaminada por N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, desde efectos agudos como la metahemoglobinemía, en la reproducción como abortos, prolongación en el tiempo para embarazo, alteraciones metabólicas como hipotiroidismo y cáncer.

## OBJETIVO

Caracterizar la concentración de pozos de la zona rural de Ciudad Lerdo y los posibles daños a la salud.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo del agua se realizó de acuerdo a lo que marca la norma oficial mexicana, NOM 014-SSA-1-1993 "Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados". La recolección de las muestras de agua se llevó a cabo en los domicilios que tenían pozo (noria) y en los pozos de distribución de agua, así como en los pozos agrícolas, colocando cada una de las muestras en un recipiente de plástico debidamente etiquetado y herméticamente sellado con los datos: número de pozo (si lo tenía etiquetado el pozo o si lo proporcionaba el dueño) domicilio, apellidos de la familia y fecha de recolección para ser analizado en el laboratorio, a una temperatura de 20° C. Posteriormente se llevó a cabo el análisis por colorimetría y por electrodo ión selectivo marca Orión. El más idóneo fue el de electrodo Ión selectivo, ya que se pueden realizar las lecturas en campo, y por su exactitud en los resultados.

## RESULTADOS

Las concentraciones de nitratos en agua de pozos se encuentran la tabla número 1, se presenta la concentración de nitratos en agua de los pozos muestreados en la zona de estudio, así como su georeferenciación.

Tabla 1. Concentración de nitratos en los pozos muestreados y su georeferenciación

ID	N-NO <sub>3</sub>	EXPOSICIÓN	Y	X
1	39	Medio	25.429121	-103.657125
2	20	Medio	25.438489	-103.670101
3	18.6	Medio	25.438489	-103.670101
4	48	Medio	25.449115	-103.678851
5	40	Medio	25.456169	-103.670297
6	64	Medio	25.391389	-103.676667
7	123	Alto	25.433426	-103.681055
8	22.5	Medio	25.435820	-103.686031
9	18	Medio	25.455080	-103.684626
10	11.8	Medio	25.460000	-103.675000
11	4.7	Bajo	25.460000	-103.671940
12	3.9	Bajo	25.459282	-103.679845
13	3.1	Bajo	25.464500	-103.678056
14	6.2	Bajo	25.464750	-103.678333

permitido por la norma 127. Aunque no todos los pozos son para consumo humano, como ya se indicó anteriormente, la población consume de ellos principalmente en las pequeñas propiedades o por la cercanía de los mismos lo que representa un riesgo a la salud de contraer enfermedades como eritrohemoglobinemia en los niños, alteraciones en la reproducción femenina, como abortos, y cáncer.

## DISCUSIÓN

Las concentraciones de nitratos en la zona variaron de 3 a 124 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gran parte de esta problemática se atribuye a la sobrefertilización de los campos, coincidimos con Orona et al. 2006, en su estudio, los resultados encontrados indican que la producción de forrajes representa más del 90 por ciento de la agricultura regional, en la que más del 80% de los agricultores emplea fertilizantes y otros productos químicos. Los pobladores de la zona de estudio consumen agua con concentraciones de nitratos entre 11.80 a 74, 124 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> dichos niveles sobrepasan lo recomendado para consumo humano de 10mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por la NOM 127 SSA. En una evaluación de riesgos realizada en Chile por Arumi et al 2006, mencionan que la concentración media de los pozos muestreados fue de 5.2 mg/L, éste es un valor inferior al límite de seguridad recomendado de 10mg/L, la mediana fue de 2.6 mg/L, valor mucho menor al límite recomendado. Los resultados de la zona de estudio muestran que la mediana fue de 16mg/L, por arriba del límite de seguridad. Si bien el 45% de los pozos no son un riesgo para la población de los niños el 55% si lo representan. De acuerdo a la literatura, la ingesta de agua con concentraciones superiores al límite de referencia, (10mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) aumenta el riesgo de causar efectos en la salud como son las alteraciones en glándula tiroides, linfoma no Hodgkin, áreas de hipoxia en placenta, cáncer gástrico, (Ward. 1996, 2006, Freedman, 2000, Sandor, 2001, Tajtakova, 2000).

## CONCLUSIÓN

De los 62 pozos muestreados en la zona de estudio el 64.5% están contaminados por N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, tanto para uso agrícola como para consumo humano, estos niveles sobrepasan la referencia de 10mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> marcados por la NOM 127 SSA. Lo que representan un riesgo para enfermedades agudas como eritrohemoglobinemia en niños y efectos subcrónicos como hipotiroidismo y crónicos como el cáncer.

## LITERATURA CITADA

Agency, U. S. E. P. (2003). "Integrated Risk Information System (IRIS), Nitrate (CASRN 14797-55-8)." USEPA: <http://www.epa.gov/iris/subst/0076.htm>.

Arumi JL, N. J., Salgado L, Claret M. (2006). "Evaluación del riesgo de contaminación con nitrato de pozos de suministro de agua potable rural en Chile." *Rev Panam Salud Pública* 20(6): 385-392.



## Polymorphisms *FTO* rs9939609, *PPARG* rs1801282 and *ADIPOQ* rs4632532 and rs182052 but not lifestyle are associated with obesity related-trait in Mexican children

Muñoz-Yáñez C<sup>1</sup>, Pérez-Morales R<sup>2</sup>, Moreno-Macías H<sup>3</sup>, Calleros-Rincón E<sup>2</sup>, Ballesteros G<sup>4</sup>, González R.A.<sup>4</sup> and Espinosa J<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México.

<sup>3</sup>Departamento de Economía, División CSH de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, D.F. México, México.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

### Abstract

Concerning the genetic factors of obesity, no consistent association between populations has been reported, which may be due to the frequency of polymorphisms, the lifestyle of studied populations and its interaction with other factors. We studied a possible association of polymorphisms *FTO* rs9939609, *PPARG* rs1801282, and *ADIPOQ* rs4632532 and rs182052 with obesity phenotypes in 215 Mexican children. Glucose, triglycerides, cholesterol, HDL and LDL were measured. In addition, weight, height, waist circumference and triceps skin thickness were recorded. High-energy diets and sedentary behavior were evaluated with a validated questionnaire. In contrast with other reports, only *FTO* rs9939609 was associated with obesity related-trait, including BMI ( $p = 0.03$ ), waist circumference ( $p = 0.02$ ), triceps skinfold ( $p = 0.03$ ) and waist/height ratio ( $p = 0.01$ ), and also with cholesterol levels ( $p = 0.02$ ) and LDL ( $p = 0.009$ ). Lower levels of triglycerides ( $p = 0.04$ ) were related with presence of *PPARG* rs1801282, while *ADIPOQ* rs4632532 showed an effect on HDL ( $p = 0.03$ ) levels. On the other hand, diet, physical activity and screen time were not related with obesity. In summary, only *FTO* rs9939609 was associated with obesity related-trait, while *PPARG2* rs1801282 and *ADIPOQ* rs4632532 were involved in lipid metabolism.

**Keywords:** Obesity, children; polymorphisms, energy intake, physical activity, lipid profile.

Received: November 4, 2015; Accepted: February 29, 2016.

### Introduction

Obesity is a worldwide public health problem due to its association with chronic diseases, such as type 2 diabetes, hypertension, cardiovascular disorders and certain types of cancer. Obesity results from an interaction of social, psychological, genetic and environmental factors, like diet and physical exercise. The last National Health and Nutrition Survey found that the national prevalence of childhood overweight did not increase. However, in the Mexican state of Durango the childhood obesity raised from 22.9% in 2006 (Shamah-Levy and Villalpando-Hernández, 2007) to 37.5% in 2012 (Rivero-Vázquez, 2013), which might be the result of different genetic backgrounds of Mexico's

Northern populations (Silva-Zolezzi *et al.*, 2009). Many studies have demonstrated that genetic factors have an important role in the development of obesity, although results are different depending on the population being evaluated.

One of the most studied genes, the *PPARG* is a member of the nuclear hormone receptors super-family, which regulates transcription of genes involved in several biological functions, such as cell growth, adipocyte differentiation, metabolism of cholesterol and fatty acids, cell survival, ubiquitination and adaptive thermogenesis. *PPARG* is activated by lipophilic hormones, fatty acids from the diet, and their metabolites (He, 2009). The Ala allele of the polymorphism Pro12Ala of *PPARG* was associated with obesity in a population from Spain (OR = 2.36,  $p = 0.03$ ) and from India (OR = 3.2,  $p = 0.02$ ) (González-Sánchez *et al.*, 2002; Bhatt *et al.*, 2012), while the Pro allele was a risk factor for type 2 diabetes in a French population (OR = 1.37,  $p = 0.04$ ) (Ghoussaini *et al.*, 2005).

Send correspondence to Jorge Espinosa. Facultad de Medicina, Universidad Juárez del Estado de Durango, Calz. Palmas 1 y Sixto Ugalde s/n. Col. Revolución. C.P. 35050 Gómez Palacio, Durango, Mexico. E-mail: dr.jorge.espinosa@gmail.com

*FTO* was the first gene to be associated with obesity by genome-wide association studies (GWAs). Adults homozygous the A allele, in rs9939609 polymorphism, weight on average 3 - 4 kg more and have a 1.67-fold increased risk of obesity (Frayling *et al.*, 2009). However, *FTO* functions are not yet fully described; an *in vitro* study showed that it acts as a co-activator of the C/EBP family of transcriptional regulators, which in conjunction with *PPARG* are necessary for adipocyte differentiation (Wu *et al.*, 2010). In addition, it is expressed in proopiomelano-cortin-producing neurons participating in the satiety cycle (Tung *et al.*, 2010). Accordingly, epidemiological studies support an association of the A allele with increased caloric intake (Speakman *et al.*, 2008), and loss of overeating control (Tanofsky-Kraff *et al.*, 2009). *FTO* rs9939609 was also associated with risk of obesity in a Mexican (OR = 1.38, p = 0.03) and Chinese populations (OR = 1.29, p = 0.001) (Villalobos-Comparán *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2010)

The less studied *ADIPOQ* gene encodes adiponectin, a hormone secreted by adipose tissue into plasma, where it binds with receptors in muscle and liver, and participates in glucose uptake and beta-oxidation of lipids. Adiponectin levels were associated with obesity and insulin resistance in an Italian population (Filippi *et al.*, 2004). In a Mexican American population, *ADIPOQ* polymorphisms rs4632532 and rs182052 increased BMI (p = 0.032 and p = 0.029, respectively) (Richardson *et al.*, 2006);. Polymorphism rs182052 was related with low expression levels of adiponectin, in a Chinese population (Ong *et al.*, 2010).

In this study, we investigated the association between polymorphisms *FTO* rs9939609, *PPARG2* rs1801282, and *ADIPOQ* rs4632532 and rs182052 with obesity-related traits in a Mexican population with high prevalence of childhood obesity.

## Materials and Methods

### Subjects

Two hundred and fifteen Mexican mestizo children (108 males and 107 females, ranging from 6.1 to 12.3 years old), whose parents and grandparents were born in Mexico, were selected to participate in the study. Sampling was performed on ten public elementary schools from the bordering cities of Gómez Palacio and Lerdo, in the state of Durango, Mexico, between January and June 2012. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Facultad de Medicina of the Universidad Autónoma de Coahuila, Mexico, and all parents signed an informed consent.

The BMI is an attempt to quantify the amount of tissue mass (muscle, fat, and bone) in an individual. It is defined as the body mass divided by the square of the body height, and is universally expressed in units of kg/m<sup>2</sup>. The waist/height ratio is a better predictor of a person's metabolic risk (Browning *et al.*, 2010) and is defined as waist circumference (cm) divided by height (cm). Triceps skin-

fold thickness is measured in the right arm with Lange calipers. All children were assessed and measurements were recorded according to an established protocol (Shamah-Levy and Villalpando-Hernández, 2007). The "overweight/obese" group was established using the age- and sex-specific BMI cutoff specified by the International Obesity Task Force (IOTF) (Cole *et al.*, 2000) and by the World Health Organization (De Onis *et al.*, 2007). Blood samples were drawn after overnight fasting. Total cholesterol, HDL (both by CHOD-PAP, Randox Laboratories Ltd. Ardmore, Crumlin, UK) and Triglyceride (Pointe Scientific Inc. Detroit, Michigan, US) levels were evaluated by enzymatic colorimetric methods. LDL levels were calculated using Friedewald's formula. Glucose levels were measured by Glucose Oxidase method (Randox Laboratories Ltd. Ardmore, Crumlin, UK). Plasma glucose levels were measured within 2 hours after the sample was obtained and plasma samples were stored at -20°C until analysis for the other biochemical parameters.

Dietary information was obtained by a semi-quantitative food frequency questionnaire (FFQ) applied to mothers or caregivers by trained personnel. The questionnaire included 101 food items classified in 14 groups and was used by the National Institute of Public Health in The National Survey of Health and Nutrition 2006 (ENSANUT2006) (Shamah-Levy and Villalpando-Hernández, 2007). The interviewers asked about portions that were consumed by the children (times per week, times per day, and size) for each food item during the seven-day period prior to the interview. Dietary energy intake and source were calculated using the free specialized SNUT software (Rivera-Dommarco *et al.*, 2001). The number of hours per week that children engaged in intense physical activity were also asked, and recorded as Metabolic Equivalent (MET)/hour (a unit of MET represents a multiple of the oxygen consumption when at rest, which corresponds to 3.5 mL O<sub>2</sub>kg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>). For example, if a person exercising expends 10 METs, he /she is using 10 times the amount of oxygen consumed when at rest) (Ridley *et al.*, 2008; Morales-Ruán *et al.*, 2009). Energy intake was assessed considering plausible intake levels according to the methodology used for ENSANUT2006 (Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2009). Children with reported energy intake above 5 standard deviations (outliers) or below 25% of the recommended caloric intake (extreme malnutrition) were excluded from the obesogenic environment analysis because these values are not biologically plausible (n=164). Atypical food consumptions were manually reviewed and when a clear mistake was detected or if the value was not plausible, the participant was excluded.

### Genotyping assays

Genomic DNA was isolated from peripheral white blood cells (3mL blood in EDTA) using the salting out method (Lahiri and Nurnberger, 1991). Genotyping assays

were performed with TaqMan probes in the ABI Prism 7900HT sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the probes C\_1129864\_10 for *PPARG* rs1801282, C\_30090620\_10 for *FTO* rs9939609, C\_2412785\_10 for *ADIPOQ* rs4632532 and C\_27807233\_10 for *ADIPOQ* rs182052 according to manufacturer's instructions (Applied Biosystems).

### Statistical analysis

The quantitative variables were reported as medians and interquartile ranges. Allele and genotype frequencies were estimated by direct gene counting. The Hardy-Weinberg equilibrium was estimated using a Chi-square test. All the analyses were performed considering the cutoffs for obesity established by IOTF. Logistic regression models adjusted for age and gender were used to test associations of each genotype with overweight/obesity. We also analyzed the effect of polymorphisms on several anthropometric (waist circumference, arm circumference, triceps skinfold thickness, waist circumference/height ratio) and metabolic parameters (glucose, triglycerides, cholesterol, HDL, LDL) using linear regressions under an additive model adjusted by gender and age. All quantitative traits were logarithmically transformed before statistical analysis

because some variables did not follow a normal distribution. Association analyses were performed using the STATA 11.1 software. Statistical significance was considered at  $p$ -values < 0.05 for all comparisons.

## Results

The prevalence of overweight/obesity in the 215 evaluated children was 43.72% and 39.07% based in the IOTF and WHO cutoffs, respectively (Table 1); no significant difference was observed in the association analysis using the different cutoffs. The obesogenic environment analysis showed that children consumed more fat and less protein than recommended (Casanueva and Kaufer, 2008). Also, screen time was above the limit established by the American Association of Pediatrics (2h/day), and triceps skinfold thickness was higher than the normal for the median age (Casanueva *et al.*, 2008). No significant associations were observed between obesogenic environment and obesity or related traits (data not shown).

Regarding the genetic background, we found a very high percentage of children with familiar history of obesity-related diseases such as diabetes mellitus (63.96%) and hypertension (59.90%). Some children had levels of biochemical parameters above the reference values (Interna-

**Table 1** - General characteristics of the population studied.

Variables	n (%)
<b>Gender</b>	
Male	108 (50.23)
Female	107 (49.77)
<b>IOTF cutoff</b>	
Normal weight	121 (56.28)
Overweight/Obesity	94 (43.72)
<b>WHO cutoff</b>	
Normal weight	131 (60.93)
Overweight/Obesity	84 (39.07)
<b>Median (Min-Max)</b>	
<b>Age (years)</b>	10.4 (6.10–12.30)
<b>Anthropometric</b>	
Waist circumference (cm)	64.25 (48.95–96.85)
Arm circumference (cm)	21.95 (13.50–35.50)
Triceps (mm)	15.00 (5.50–28.00)
Waist/height ratio	0.46 (0.35–0.63)
<b>Obesogenic Environment*</b>	
Energy intake (kJ/d)	8837.62 (4235.32–19608.62)
Carbohydrates (%)	47.14 (21.37–73.14)
Protein (%)	13.81 (8.48–20.67)
Fat (%)	43.05 (20.18–64.52)
Physical activity (h/week)	5 (1–6)
Screen hours (h/week)	17 (2–32)

\*n=164 children included. IOTF: International Obesity Task Force; WHO: World Health Organization.

tional Diabetes Federation) (Zimmet *et al.*, 2007) (Table 2). The minor allele frequencies were 0.22 for *PPARG* rs1801282, 0.35 for *FTO* rs9939609, 0.61 for *ADIPOQ* rs4632532 and 0.63 for *ADIPOQ* rs182052, which are within range from those reported in other populations (Table 3). Genotype frequencies in all genes were in accordance with the Hardy-Weinberg equilibrium.

In respect to the association of genotypes with obesity, under an additive model, the OR was 1.25 (CI = 0.73 – 2.15) for *PPARG* rs1801282, 1.27 (CI = 0.82 – 1.98) for *FTO* rs9939609, 1.47 (CI = 0.78 – 2.74) for *ADIPOQ* rs4632532 and 1.43 (CI = 0.76 – 2.74) for *ADIPOQ* rs182052. A risk tendency was observed, although these values were not significant (Table 3). The association, however, was assessed under the codominant, dominant and recessive models and the risk trend was preserved (data not shown). The analysis of genotypes with obesity-related characteristics found that *FTO* was associated with BMI ( $\beta = 0.46$ ,  $p = 0.03$ ), waist circumference ( $\beta = 0.03$ ,  $p = 0.02$ ), triceps skinfold ( $\beta = 0.08$ ,  $p = 0.03$ ) and waist/height ratio ( $\beta = 0.03$ ,  $p = 0.01$ ) (Table 4). Additionally, *FTO* had an effect on total cholesterol ( $\beta = 0.06$ ,  $p = 0.02$ ) and LDL ( $\beta = 0.12$ ,  $p = 0.01$ ) levels, although the increase was modest; in contrast *ADIPOQ* rs4632532 and *PPARG* rs1801282 were associated with a slight decrease in levels of HDL ( $\beta =$

**Table 2** - Biochemical parameters and hereditary backgrounds.

Biochemical parameters	Median (Min-Max)	% Above reference value*
Glucose (mg/dL)	79.87 (58.34–113.07)	5 (2.33)
Cholesterol (mg/dL)	148.49 (84.80–353.70)	25 (11.63)
Triglycerides (mg/dL)	78.29 (26.58–221.60)	16 (7.44)
HDL (mg/dL)	53.66 (23.95–104.75)	46 (21.40)
LDL (mg/dL)	74.21 (24.38–299.34)	14 (6.51)
Familial history	n (%)	
Diabetes mellitus	126 (63.96)	
Hypertension	118 (59.90)	
Dyslipidemia	73 (37.06)	
Cardiovascular	42 (21.32)	

\* According to International Diabetes Federation (IDF)(Zimmet *et al.*, 2007)

–0.06,  $p = 0.03$ ) and triglycerides ( $\beta = -0.11$ ,  $p = 0.04$ ), respectively (Table 5).

## Discussion

In this study, several risk factors of obesity were evaluated in a Mexican children population. The results revealed that genetic factors were associated with obesity

**Table 3** - Comparison of association of *FTO* rs9939609, *PPARG2* rs1801282, and *ADIPOQ* rs4632532 and rs182052 with obesity in different populations.

Polymorphism	Allelic Frequency	Model	OR	IC 95%	Population	Reference
<b><i>PPARG</i> rs1801282</b>						
	G = 0.09	Additive	2.36	1.10–5.05	Caucasian	González-Sánchez, <i>et al.</i> , 2002
	G = 0.06	Dominant	2.85	1.07–7.62	Caucasian	Morini, <i>et al.</i> , 2008
	G = 0.05	Dominant	0.64	0.42–0.76	Chinese	Wang, <i>et al.</i> , 2013
	G = 0.11	Recessive	3.2	1.2–12.9	Indian	Bhatt, <i>et al.</i> , 2012
	<b>G = 0.22</b>	<b>Additive</b>	<b>1.25</b>	<b>0.73–2.15</b>	<b>Mexican - Mestizo</b>	<b>This study</b>
<b><i>FTO</i> rs9939609</b>						
	A = 0.19	Additive	1.41	1.15–1.76	Mexican - Mestizo	León-Mimila, <i>et al.</i> , 2013
	A = 0.20	Additive	2.42	1.71–3.44	Mexican - Mestizo	Villalobos-Camparán, <i>et al.</i> , 2008
	A = 0.12	Additive	1.29	1.11–1.49	Chinese	Xi, <i>et al.</i> , 2010
	A = 0.42	Additive	1.27	1.20–1.34	Caucasian	Andreasen, <i>et al.</i> , 2008
	A = 0.59	Recessive	1.97	1.29–3.00	Caucasian	Luczynski, <i>et al.</i> , 2012
	<b>A = 0.35</b>	<b>Additive</b>	<b>1.27</b>	<b>0.82–1.98</b>	<b>Mexican - Mestizo</b>	<b>This study</b>
<b><i>ADIPOQ</i></b>						
rs4632532	T = 0.48	Codominant	Increase in BMI		Mexican - American	Richardson, <i>et al.</i> , 2005
	T = 0.45	Codominant	Increase in BMI		Hispano - American	Sutton, <i>et al.</i> , 2005
	<b>T = 0.61</b>	<b>Additive</b>	<b>1.47</b>	<b>0.78–2.74</b>	<b>Mexican - Mestizo</b>	<b>This study</b>
rs182052	G = 0.37	Additive	1.22	1.05–1.42	Afroamerican	Bostrom, <i>et al.</i> , 2008
	G = 0.48	Codominant	Increase in BMI		Mexican - American	Richardson, <i>et al.</i> , 2005
	G = 0.44	Codominant	Increase in BMI		Hispano - American	Sutton, <i>et al.</i> , 2005
	<b>G = 0.63</b>	<b>Additive</b>	<b>1.43</b>	<b>0.76–2.74</b>	<b>Mexican - Mestizo</b>	<b>This study</b>

**Table 4** - Association of polymorphisms with obesity-related traits

Measurements	<i>FTO</i> rs9939609	<i>PPARG</i> rs1801282	<i>ADIPOQ</i> rs4632532	<i>ADIPOQ</i> rs182052
BMI	$\beta$ (CI 95%, P-value) <b>0.46</b> <b>(0.005 – 0.08, 0.03)</b>	$\beta$ (CI 95%, P-value) -0.004 (-0.05 – 0.04, 0.87)	$\beta$ (CI 95%, P-value) 0.005 (-0.03 – 0.04, 0.75)	$\beta$ (CI 95%, P-value) -0.003 (-0.04 – 0.03, 0.84)
Waist circumference (cm)	<b>0.03</b> <b>(0.006 – 0.07, 0.02)</b>	-0.01 (-0.05 – 0.02, 0.51)	0.004 (-0.02 – 0.03, 0.76)	-0.001 (0.03 – 0.02, 0.90)
Arm circumference (cm)	0.03 (-0.002 – 0.07, 0.07)	0.002 (-0.04 – 0.04, 0.92)	0.002 (-0.03 – 0.03, 0.87)	-0.005 (-0.03 – 0.02, 0.37)
Triceps (mm)	<b>0.08</b> <b>(0.007 – 0.16, 0.03)</b>	-0.03 (-0.12 – 0.06, 0.53)	-0.02 (-0.08 – 0.05, 0.59)	-0.03 (-0.10 – 0.04, 0.75)
Waist/height ratio	<b>0.03</b> <b>(0.007 – 0.06, 0.01)</b>	-0.01 (-0.04 – 0.02, 0.54)	-0.002 (-0.02 – 0.02, 0.85)	-0.003 (-0.03 – 0.02, 0.76)

Linear regression was used to compare obesity measurements by genotype, using additive model adjusted for age and gender. Significant associations ( $p < 0.05$ ) are indicated in bold. BMI: body mass index.

**Table 5** - Association of polymorphisms with biochemical parameters

Biochemical Parameter	<i>FTO</i> rs9939609	<i>PPARG</i> rs1801282	<i>ADIPOQ</i> rs4632532	<i>ADIPOQ</i> rs182052
Glucose	$\beta$ (CI 95%, P-value) 0.01 (-0.01 – 0.03, 0.36)	$\beta$ (CI 95%, P-value) -0.02 (-0.05 – 0.006, 0.11)	$\beta$ (CI 95%, P-value) 0.003 (-0.02 – 0.02, 0.75)	$\beta$ (CI 95%, P-value) 0.001 (-0.02 – 0.02, 0.95)
Cholesterol	<b>0.06</b> <b>(0.001 – 0.11, 0.02)</b>	0.01 (-0.05 – 0.07, 0.72)	-0.01 (-0.05 – 0.03, 0.64)	-0.006 (-0.05 – 0.04, 0.77)
Triglycerides	0.07 (-0.02 – 0.15, 0.14)	<b>-0.11</b> <b>(-0.22 – -0.003, 0.04)</b>	0.04 (-0.04 – 0.11, 0.30)	0.04 (-0.04 – 0.12, 0.30)
HDL	-0.02 (-0.09 – 0.05, 0.56)	0.01 (-0.07 – 0.09, 0.78)	<b>-0.06</b> <b>(-0.12 – -0.007, 0.03)</b>	-0.05 (-0.11 – 0.01, 0.12)
LDL	<b>0.12</b> <b>(0.03 – 0.22, 0.01)</b>	0.04 (-0.07 – 0.16, 0.47)	0.03 (-0.05 – 0.11, 0.43)	0.02 (-0.06 – 0.10, 0.63)

Linear regression was used to compare biochemical measurements by genotype, using additive model adjusted for age, gender and body mass index. Significant associations ( $p < 0.05$ ) are indicated in bold.

related traits, while the obesogenic environment had no effect. The frequency of risk genotypes in *FTO* rs9939609, *PPARG* rs1801282, and *ADIPOQ* rs4632532 and rs182052 was different from what has been reported in other populations. This was expected as a result, since studies show that there is variability in frequencies of polymorphisms in different populations of the same ethnicity (Table 3). In regard to the association of these genes with obesity, most studies report OR's in the range of 1.2 to 2, similar to our results, indicating that these genes are of low penetrance and their contribution to the development of obesity is small. However, the presence of several genetic factors together with other factors could have a significant effect.

The presence of polymorphism *FTO* rs9939609 was associated with an increment in BMI, waist circumference and waist/height ratio. Waist/height ratio measures the abdominal fat in any gender or age and is a better metabolic

risk predictor than BMI (Browning *et al.*, 2010; Kodama *et al.*, 2012). This result is in agreement with other studies in different populations (León-Mimila *et al.*, 2013; Luczynski *et al.*, 2012; Villalobos-Comparán *et al.*, 2008; Xi *et al.*, 2010). We also found that the A allele increases the risk of alterations in the lipid profile (cholesterol and HDL levels), as reported by other groups (Villalobos-Comparán *et al.*, 2008; Mascarenhas-Melo *et al.*, 2013). This supports the suggested activity of FTO protein, in conjunction with C/EBP, as a co-activator of PPAR gamma, which is involved in adipocyte functions, such as lipid metabolism and differentiation (Wu *et al.*, 2010).

The polymorphism *PPARG* Pro12Ala (rs1801282) has been studied in different populations with contradictory results; in some studies Ala allele was associated with obesity (Bhatt *et al.*, 2012; Morini *et al.*, 2008), whereas in a Chinese population, it was reported as a protecting factor

(Wang *et al.*, 2013). In our study, we did not find an association under any model. However, this polymorphism showed a negative association with triglycerides level ( $\beta = -0.11$ ,  $p = 0.04$ ). This can be supported by *in vitro* evidence, which shows that allele Ala presents less affinity to DNA, and as a result, the ability to induce lipogenesis is decreased (Larsen *et al.*, 2003). The different results reported for *PPARG* rs1801282 may be due to PPARG being a transcription factor that responds to the environment (high fatty acids diet) and shows epistasis with other polymorphisms in the same gene (rs2938392, rs1175542, rs1175544) and other genes (ADB3R). Therefore, specific features of the obesogenic environment may influence associations according to the population analyzed.

*ADIPOQ* rs4632532 showed an association with decreased HDL levels. The polymorphisms evaluated in this study are associated with obesity in Afro-Americans (Bostrom *et al.*, 2008) and with increased BMI, waist circumference, fasting insulin levels and skin fold thickness in Mexicans living in USA (Richardson *et al.*, 2006; Sutton *et al.*, 2005). However, those studies did not find an association with HDL levels. Adiponectin participates in the beta-oxidation of fatty acids (Kadowaki and Yamauchi, 2005), so it is possible that the polymorphic gene impacts the transport of fatty acids (in HDL) into plasma. Accordingly, a positive correlation between HDL and adiponectin levels has been reported elsewhere (Mascarenhas-Melo *et al.*, 2013). Although we did not measure plasma adiponectin, these studies support our results.

In addition to genetic factors, the obesogenic environment including diet, physical activity and screen time was evaluated, but no association was found between environmental factors and obesity or gain in anthropometric measurements. Similar results were found in the National Survey 2006 (Flores *et al.*, 2009). This study presents inaccuracies in diet records of both obese and non-obese groups. Therefore, energy intake could have been wrongly associated with obesity. This imprecision is frequently caused by the use of questionnaires as tools for diet intake assessment. The use of dietary diaries could overcome the problem; however, that method becomes impractical when large populations are surveyed.

The findings of our study are important because there are only two other studies that show association of *FTO* rs9930609 with obesity or obesity-related traits and modified lipid profile in a Mexican population. In addition, the polymorphisms of *PPARG* rs1801282 and *ADIPOQ* rs4632532 were not assessed in those previous studies. However, limitations in our study include a small sample size and difficulty determining the obesogenic environment factors.

In conclusion, this study analyzed environment and genetic aspects of obesity and found significant associations between *PPARG* rs1801282 and triglycerides levels,

*ADIPOQ* rs4632532 and HDL levels, and *FTO* rs9939609 with cholesterol, LDL and anthropometric measurements.

## Acknowledgments

This study was supported by scholarship CVU249976 (CM). We thank L.N. Lucero Torres Nava and M.C. Alejandra Mendez Hernandez for technical assistance, and Dr. Ezequiel Fuentes Pananá, for critical reading of the manuscript

## References

- Bhatt S P, Misra A, Sharma M, Luthra K, Guleria R, Pandey RM and Vikram N K (2012) Ala/Ala genotype of Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ 2 gene is associated with obesity and insulin resistance in Asian Indians. *Diabetes Technol Ther* 14:828-834.
- Bostrom MA, Freedman BI, Langefeld CD, Liu L, Hicks PJ and Bowden DW (2008) Association of adiponectin gene polymorphisms with type 2 diabetes in an African American population enriched for nephropathy. *Diabetes* 58:499-504.
- Browning LM, Hsieh SD and Ashwell M (2010) A systematic review of waist-to-height ratio as a screening tool for the prediction of cardiovascular disease and diabetes: 05 could be a suitable global boundary value. *Nutri Res Rev* 23:247-269.
- Casanueva E and Kaufer MPAB (2008) *Nutriología Médica*. 3rd edition. Panamerica Press, México, DF, p 78-85.
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM and Dietz WH (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: International survey. *BMJ* 320:1-6.
- De Onis M, Onyango AW, Borghi E, Siyam A, Nishida C and Siekmann J (2007) Development of a WHO growth reference for school children and adolescents. *Bull WHO* 85:660-667.
- Filippi E, Sentinelli F, Trischitta V, Romeo S, Arca M, Leonetti F and Baroni M G (2004) Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *Eur J Hum Genet* 12:199-205.
- Flores M, Macías N, Rivera M, Barquera S, Hernández L, García-Guerra A and Rivera JA (2009) Energy and nutrient intake among Mexican school-aged children, Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública México* 51(Suppl 4):S540-S550.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JRB and McCarthy MI (2009) A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316:889-894.
- Ghoussaini M, Meyre D, Lobbens S, Charpentier G, Clément K, Charles M-A and Froguel P (2005) Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *BMC Med Genet* 6:e11.
- González-Sánchez JL, Serrano Ríos M, Fernández Pérez C, Laakso M and Martínez Larrad, MT (2002) Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. *Eur J Endocrinol* 147:495-501.

- He W (2009) PPAR $\gamma$ 2 polymorphism and human health. *PPAR Res* 2009:e849538.
- Kadowaki T and Yamauchi T (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26:439-451.
- Kodama S, Horikawa C, Fujihara K, Heianza Y, Hirasawa R, Yachi Y and Sone H (2012) Comparisons of the strength of associations with future type 2 diabetes risk among anthropometric obesity indicators, including waist-to-height ratio: A meta-analysis. *Am J Epidemiol* 176:959-969.
- Lahiri DK and Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:544-548.
- Larsen TM, Toubro S and Astrup A (2003) PPAR $\gamma$  agonists in the treatment of type II diabetes: Is increased fatness commensurate with long-term efficacy? *Int J Obes Relat Metab Disord* 27:147-161.
- León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, Gutiérrez-Vidal R, Vega-Badillo J, Jacobo-Albavera L, Posadas-Romeros C, et al. (2013) Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in Mexican children and adults. *PLoS One* 8:e70640.
- Luczynski W, Zalewski G and Bossowski A (2012) The association of the FTO rs9939609 polymorphism with obesity and metabolic risk factors for cardiovascular diseases in Polish children. *J Physiol Pharmacol* 63:241-248.
- Mascarenhas-Melo F, Sereno J, Teixeira-Lemos E, Marado D, Palavra F, Pinto R, Rocha-Pereira P, Teixeira F and Reis F (2013) Implication of low HDL-c levels in patients with average LDL-c levels: A focus on oxidized LDL, large HDL subpopulation, and adiponectin. *Mediators Inflamm* 2013:e612038.
- Morales-Ruán MDC, Hernández-Prado B, Gómez-Acosta LM, Shamah-Levy T and Cuevas-Nasu, L (2009) Obesity, overweight, screen time and physical activity in Mexican adolescents. *Salud Pública México* 51(Suppl 4-1):S613-S620.
- Morini E, Tassi V, Capponi D, Ludovico O, Dallapiccola B, Trischitta V and Prudente S (2008) Interaction between PPAR $\gamma$ 2 variants and gender on the modulation of body weight. *Obesity* 16:1467-1470.
- Ong KL, Li M, Tso AWK, Xu A, Cherny SS, Sham PC and Lam KSL (2010) Association of genetic variants in the adiponectin gene with adiponectin level and hypertension in Hong Kong Chinese. *Eur J Endocrinol* 163:251-257.
- Richardson DK, Schneider J, Fourcaudot MJ, Rodriguez LM, Arya R, Dyer TD, Almasy L, Blangero J, Stern MP, DeFronzo RA, et al. (2006) Association between variants in the genes for adiponectin and its receptors with insulin resistance syndrome (IRS)-related phenotypes in Mexican Americans. *Diabetologia* 49:2317-2328.
- Ridley K, Ainsworth BE and Olds TS (2008) Development of a compendium of energy expenditures for youth. *Int J Behav Nutr Phys Act* 5:e45.
- Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, González de Cossío T and Hernández Prado B SJ (2001). Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado Nutricio de niños y mujeres de México. Cuernavaca, Morelos, p 188-190.
- Rivero-Vázquez S (2013) Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Durango (Vol. 2). Cuernavaca, Morelos, p 78-82.
- Rodríguez-Ramírez S, Mundo-Rosas V, Jiménez-Aguilar A and Shamah-Levy T (2009) Methodology for the analysis of dietary data from the Mexican National Health and Nutrition Survey 2006. *Salud Pública México* 51(Suppl 4):S523-S529.
- Shamah-Levy T and Villalpando-Hernández SRDJ (2007) Resultados de Nutrición de la ENSANUT 2006. Cuernavaca, México, p 44-53.
- Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J, Fernandez-Lopez JC, Uribe-Figueroa L, Contreras A and Jimenez-Sánchez G (2009) Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8611-8616.
- Speakman JR, Rance KA and Johnstone AM (2008) Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity* 16:1961-1965.
- Sutton BS, Weinert S, Langefeld CD, Williams AH, Campbell JK, Saad MF and Bowden DW (2005) Genetic analysis of adiponectin and obesity in Hispanic families: The IRAS Family Study. *Hum Genet* 117:107-118.
- Tanofsky-Kraff M, Han JC, Anandalingam K, Shomaker LB, Columbo KM, Wolkoff LE and Yanovski JA (2009) The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over. *Am J Clin Nutr* 90:1483-1488.
- Tung Y-CL, Ayuso E, Shan X, Bosch F, O'Rahilly S, Coll AP and Yeo GSH (2010) Hypothalamic-specific manipulation of FTO, the ortholog of the human obesity gene FTO, affects food intake in rats. *PLoS One* 5:e8771.
- Villalobos-Comparán M, Teresa Flores-Dorantes M, Teresa Vil-larreal-Molina M, Rodríguez-Cruz M, García-Ulloa AC, Robles L, Huertas-Vázquez A, Saucedo-Villarreal N, López-Alarcón M, Sánchez-Muñoz F, et al. (2008) The FTO gene is associated with adulthood obesity in the Mexican population. *Obesity* 16:2296-2301.
- Wang X, Liu J, Ouyang Y, Fang M, Gao H and Liu L (2013) The association between the Pro12Ala variant in the PPAR $\gamma$ 2 gene and type 2 diabetes mellitus and obesity in a Chinese population. *PLoS One* 8:e71985.
- Wu Q, Saunders R, Szkludlarek-Mikho M, La Serna ID and Chin K-V (2010). The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. *Biochem Biophys Res Commun* 401:390-395.
- Xi B, Shen Y, Zhang M, Liu X, Zhao X, Wu L and Wang X (2010) The common rs9939609 variant of the fat mass and obesity-associated gene is associated with obesity risk in children and adolescents of Beijing, China. *BMC Med Genet* 11:e107.
- Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S and Caprio S (2007) The metabolic syndrome in children and adolescents-an IDF consensus report. *Diabetes Voice* 52:29-32.

*Associate Editor: Mara H. Hutz*



# DE TORREÓN

---

Volumen 9, núm 1, 3a Época, ISSN: 1405-5422, Junio 2017

---



**FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD TORREÓN**

**ARTÍCULOS ORIGINALES**

Actividades de la vida diaria en adultos mayores de la Región Lagunera: Un estudio descriptivo

1

Control de Diabetes Mellitus tipo 2 e Hipertensión Arterial Sistémica y factores de estilo de vida asociados en pacientes del Centro Integral de Atención Comunitaria

4

Control metabólico en pacientes pediátricos con Diabetes Mellitus tipo I con Inyecciones Múltiples de Insulina (IMIS) vs Infusión Continua de Insulina Subcutánea (ICIS)

9

Efecto de la exposición a la Permetrina y Malatiōn en la generación de alteraciones en el Gen IgH $\beta$ , asociado a Leucemia Linfoblástica Aguda

13

Eficacia de la determinación de longitud de trabajo de dos localizadores de ápice VDW gold y RAYPEX 6: estudio in vitro

21

Evaluación del Estado Nutricional en niños en edad escolar en Piedras Negras, Coahuila, 2016: Un estudio piloto.

25

Factores asociados a la presencia de enfermedad en cuidadores familiares de adultos mayores con Alzheimer: Una revisión sistemática

32

Frecuencia de Maloclusiones en pacientes que acuden a la Clínica del Posgrado de Ortodoncia de la Facultad de Odontología de la U A de C Unidad Torreón, Enero - Diciembre 2015

37

Metodología para elaboración de un Manual de Educación en Diabetes tipo 2 para el Autocuidado de Adultos Mayores basado en Taxonomías NANDA-NOC-NIC

41

Niveles de Carboxihemoglobina y su relación con Tabaquismo en alumnos de la Facultad de Ciencias Químicas de Gómez Palacio Durango

45

Prevalencia de Calcificación Aortica en pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis en el ISSSTE Saltillo

51

Relación de las variables Electrocardiográficas con la Obesidad Corporal

55

Resistencia Antimicrobiana de *E. Coli* aislada de población infantil en una región Norte de México

61

**CASO CLÍNICO**

Lemomioma Retroperitoneal: Reporte de Caso

65

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Centro de Investigación Biomédica Universidad Autónoma de Coahuila., <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango., <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular y Ultraestructura, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila.

\*Autor de Correspondencia: Ehollivas27@gmail.com

### Resumen.

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular presente en los hematíes en altas concentraciones, fijan oxígeno en los pulmones y lo transportan a través de la sangre hacia los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. El monóxido de carbono (CO), es un gas incoloro e inodoro que se forma por la combustión incompleta de material orgánico. El CO, que por sus características fisicoquímicas, utiliza múltiples mecanismos de toxicidad que explican sus efectos adversos en la salud humana, una de ellas es a través de la unión del gas con la hemoglobina formando la carboxihemoglobina (COHb). Se reclutaron a 50 estudiantes con un rango de edad entre 17 y 25 años. Se obtuvieron muestras de sangre total para evaluar el %COHb a través del método de reducción del ditionito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (Beutler y West, 1984), asimismo, se aplicó un cuestionario para evaluar las características sociodemográficas y estilos de vida en la población estudiada. En los fumadores, el índice de tabaquismo medidos como paquete/año fue 0.4, se observó un menor índice tabáquico en mujeres con respecto a los hombres (0.38 vs 0.44). La frecuencia de exposición al humo de segunda mano en nuestra población fue de 26%. El %COHb se encontró mayor en fumadores pasivos en comparación con los fumadores activos ( $0.798 \pm 0.123$  vs  $0.547 \pm 0.98$ , respectivamente) ( $p < 0.05$ ). La concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) es mayor en los grupos de fumadores y fumadores pasivos con respecto al grupo de referencia (no fumadores) ( $p < 0.05$ ). El humo de segunda mano se asoció a un mayor % de COHb y la MCHC se incrementa con la exposición al humo del tabaco.

**Palabras Clave:** Tabaquismo, Monóxido de Carbono, Carboxihemoglobina.

### Abstract.

The hemoglobin (Hb) is a globular protein present in red blood cells in high concentrations, attaches oxygen to the lungs and transports through the blood to the tissues and cells surrounding the capillary bed of the vascular system. The carbon monoxide (CO) is a colorless, odorless gas formed by the incomplete combustion of organic material. The CO, which due to its physicochemical characteristics, uses multiple mechanisms of toxicity that explain its adverse effects on human health, one of them is through the union of the gas with the hemoglobin forming the carboxyhemoglobin (COHb). A total of fifty students with a range between 17 and 25 years old were recruited. Total blood samples were obtained to evaluate the% COHb through the sodium dithionite reduction method ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) (Beutler y West, 1984). A questionnaire was applied to evaluate sociodemographic characteristics and lifestyles in the population studied. In smokers, the smoking rate measured as package / year was 0.4, a lower smoking rate was observed in women compared to men (0.38 vs 0.44). The frequency of exposure to secondhand smoke in our population was 26%. The% COHb was found to be higher in passive smokers compared to active smokers ( $0.798 \pm 0.123$  vs  $0.547 \pm 0.98$ , respectively) ( $p < 0.05$ ). The mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) was higher in the groups of smokers and passive smokers than in the reference group (non-smokers) ( $p < 0.05$ ). Conclusion: secondhand smoke was associated with a higher% of COHb and the MCHC increases with exposure to tobacco smoke.

**Keywords:** Smoking, Carbon Monoxide, Carboxyhemoglobin.

responsable de 10 millones de muertes, concretamente la primera causa de fallecimiento prevenible (OMS, 2003). En México, la Encuesta Nacional Sobre las Adicciones (ENA, 2011) señala que el tabaquismo es una de las principales dependencias en nuestro país; el 21.7 % (aproximadamente 17.3 millones) de los mexicanos entre 12 y 65 años ha fumado tabaco alguna vez en su vida, el 8.9% fuman diariamente y el 12.8% fuma ocasionalmente. Además, la población con mayor riesgo, son los jóvenes de acuerdo con la encuesta sobre tabaquismo (ETJ, 2011). En el 2010 se estimó que aproximadamente el 27.8% de los estudiantes fumadores tenían entre 13 y 15 años de edad (Waters *et al.*, 2010). El tabaquismo es un importante problema social y de salud pública, por lo que también representa un problema económico relevante, ya que los costos de la atención médica de las enfermedades asociadas al tabaquismo se calcularon con un costo entre 45,000 y 75,200 millones de pesos en el 2011 (Llanes *et al.*, 2009).

Durante el proceso de combustión de la hoja seca del tabaco se llevan a cabo reacciones químicas que producen cerca de 4000 sustancias tóxicas que incluyen amoníaco, ácido cianohídrico y nitrógeno, además de benzo[a]pireno, nitrosaminas, aminas aromáticas y monóxido de carbono. Se ha demostrado que estos compuestos tienen un alto poder toxicológico. Cuando el monóxido de carbono se combina con la hemoglobina, la cual está formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos  $\alpha$  y dos  $\beta$ , puede ligar el carbono del mismo modo que el oxígeno, produciendo la carboxihemoglobina COHb (Vera, 2010).

La molécula de hemoglobina dispone de cuatro sitios de unión con el oxígeno, cuando uno de estos sitios es ocupado por el monóxido de carbono, la hemoglobina se altera de tal forma que impide que los otros sitios se unan al oxígeno, produciendo así una disociación oxígeno-hemoglobina. Esta alteración empeora la hipoxia celular producida por la formación de COHb (Téllez *et al.*, 2006). De acuerdo a los antecedentes, es relevante considerar que los jóvenes universitarios están expuestos al humo del tabaco de manera voluntaria o involuntaria debido a la alta frecuencia de consumo entre los jóvenes. Por lo tanto, es necesario evaluar la concentración de COHb, y algunos parámetros de la biometría hemática para establecer si existe relación con el consumo de cigarrillos en los alumnos de la Facultad de Ciencias Químicas, unidad Gómez Palacio.

#### Materiales y Métodos.

La población fue reclutada de la Facultad de Ciencias Químicas unidad Gómez Palacio, en el estudio se incluyó un total de 50 estudiantes de ambos sexos, entre ellos se encontraban: fumadores, fumadores pasivos y no fumadores.

Se les aplicó un cuestionario para obtener información sobre las características sociodemográficas, tabaquismo,

20 (número de cigarrillos por cajetilla)

Se realizó una toma de muestra sanguínea por el método de venopunción en tubos con anticoagulante de heparina de sodio, se recolectó aproximadamente 5 ml de sangre total, y posteriormente se realizó su análisis en el Laboratorio Multidisciplinario de la Facultad de Ciencias Químicas UJED, unidad Gómez Palacio, Durango.

La determinación de COHb en sangre total se realizó a través de una técnica espectrofotométrica UV. El método utilizado fue descrito por Beutler E & West C en 1984, se basa en la producción de 2 mezclas de pigmentos por la reducción de la oxihemoglobina y la metahemoglobina con el hidrosulfito de sodio, las absorbancias de los diferentes pigmentos se miden a 420 y 432 nm, respectivamente. Los resultados son reproducibles y estables si se mantiene un pH de 6.85 mediante el uso de soluciones buffer. Este método es uno de los más usados y ha demostrado buenos resultados para el análisis de COHb. Se tomaron 100 $\mu$ L a partir de los 5 ml de sangre periférica, se le adicionó 12 ml de solución hemolizante, se mezcló 3 veces para incorporar el reactivo con la muestra y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se tomó 100 $\mu$ L del hemolizado previamente preparado y se le adicionó 2.3 ml de la solución diluyente de COHb, se mezcló varias veces para incorporar el reactivo con la mezcla y se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/visible con las absorbancias de 420 y 432 nm, respectivamente, utilizando como blanco la solución diluyente de COHb. Se utilizó la siguiente ecuación para calcular la fracción de COHb (ScO) en sangre.

$$ScO = \frac{1 - (Ar \times F1)}{Ar(F2 - F1) - F3 + 1}$$

Ar= Radio A420/A432 del hemolizado en solución diluyente COHb.

Las tres constantes F1, F2 Y F3 pueden ser calculadas de las absorbancias molares publicadas del COHb a 420 Y 432nm.

F1= 1.3330

F2= 0.4787

F3= 1.9939.

Cada muestra fue analizada por citometría de flujo con citoquímica en el instrumento ADVIA® 120 (Hematology System, SIEMENS). Los datos obtenidos se clasificaron en 6 parámetros evaluados: recuento de glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), volumen corpuscular medio (MVC), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración media de hemoglobina corpuscular (MCHC).

entre las concentraciones de COHb y los valores de cada una de las variables dependientes a medir. El paquete estadístico utilizado fue STATA 11.1 (Stata Corp., College Station, TX).

### Resultados.

Se reclutó un total de 50 sujetos para este estudio, se observó que el promedio de edad en la población total fue

hombres representaron la mayor proporción de fumadores ( $p<0.05$ ), sin embargo, la exposición pasiva al humo del tabaco fue mayor en las mujeres estudiadas. Por otro lado, al evaluar la exposición a CO a través de otras fuentes de emisión, se observó que el 94% de los sujetos cocinaban con gas LP, de igual forma, no resultó significativo el estar residiendo cerca de lugares que emiten este gas (Tabla 1).

Tabla 1.- Características sociodemográficas de la población. Los datos son presentados en media, desviación estándar, rango y porcentajes.

	Población total (n= 50)	Alumnos no fumadores (n= 12)	Alumnos con tabaquismo pasivo (n= 19)	Alumnos Fumadores (n= 19)
Edad (Años)	20.32 ± 1.62 (17-20)	19.63 ± 1.54 (17-22)	20.77 ± 1.80 (18-25)	20.33 ± 1.41 (18-22)
Sexo n (%)				
-Femenino	25 (50)	8 (66.7)	10 (52.6)	7 (36.8)*
-Masculino	25 (50)	4 (33.3)	9 (47.4)*	12 (63.2)*
Domicilio actual n (%)				
-Zona urbana	49 (98)	12 (100)	18 (94.7)	18 (94.7)
-Zona rural	1 (2)	0	1 (5.3)	1 (5.3)
Combustible para cocinar n (%)				
-Gas LP	47 (94)	12 (100)	17 (89.4)	18 (94.7)
-Aceite y combustible	3 (6)	0	2 (10.6)	1 (5.3)
Vive acerca de alguna industria n (%)				
-Gasolinera	16 (32)	3 (25)	6 (31.8)	7 (36.8)
-Térmoelectrica	1 (2)	0	0	1 (5.3)
-Cementera	1 (2)	0	1 (5.3)	0
-Ladrillera	3 (6)	1 (8.3)	1 (5.3)	1 (5.3)
-Industria	6 (12)	2 (16.6)	2 (10.6)	2 (10.6)
-Establo	2 (4)	2 (16.6)	0	0
-Fundidora	2 (4)	0	0	2 (10.6)
-Maquiladora	2 (4)	0	1 (5.3)	1 (5.3)
-Ninguna de las anteriores	17 (34)	4 (33.3)	8 (42.10)	5 (26.5)

T student, Fisher test \* $p<0.05$  (Grupo de fumadores, fumadores pasivos vs grupo de no fumadores)

El 28% (14 sujetos) de la población total vive cerca de donde desechan o queman basura (a menos de 1000 metros), de ellos, el 35.7% y el 50%, pertenecen a los grupos de exposición al humo de segunda mano y al de fumadores, respectivamente. Las personas que practican actividades físicas al aire libre, y que además, las realizan en zonas con alto tránsito vehicular son, en su mayoría fumadores activos ( $p<0.05$ ). El promedio de personas que habitan en la vivienda de la población total fue de 2.76 esto significa que por vivienda viven aproximadamente tres personas. En el grupo de los alumnos fumadores pasivos se encontró que el 52.6% mantenían una convivencia con personas fumadoras activas en el hogar (Tabla 2). Otro tipo de exposición al tabaco de segunda

mano fue reportada en las reuniones sociales con amigos y otros familiares (Dato no presentado). El 37% de los fumadores se exponen también al humo de segunda mano (Tabla 2).

Se realizó un análisis bivariado en el que se evaluó la relación entre las concentraciones de COHb y los valores de cada una de las variables dependientes a medir. El paquete estadístico utilizado fue STATA 11.1 (Stata Corp., College Station, TX).

### Resultados.

Se reclutó un total de 50 sujetos para este estudio, se observó que el promedio de edad en la población total fue

hombres representaron la mayor proporción de fumadores ( $p<0.05$ ), sin embargo, la exposición pasiva al humo del tabaco fue mayor en las mujeres estudiadas. Por otro lado, al evaluar la exposición a CO a través de otras fuentes de emisión, se observó que el 94% de los sujetos cocinaban con gas LP, de igual forma, no resultó significativo el estar residiendo cerca de lugares que emiten este gas (Tabla 1).

Tabla 1.- Características sociodemográficas de la población. Los datos son presentados en media, desviación estándar, rango y porcentajes.

	Población total (n= 50)	Alumnos no fumadores (n= 12)	Alumnos con tabaquismo pasivo (n= 19)	Alumnos Fumadores (n= 19)
Edad (Años)	20.32±1.62 (17-20)	19.63±1.54 (17-22)	20.77±1.80 (18-25)	20.33±1.41 (18-22)
Sexo n (%)				
-Femenino	25 (50)	8 (66.7)	10 (52.6)	7 (36.8)*
-Masculino	25 (50)	4 (33.3)	9 (47.4)*	12 (63.2)*
Domicilio actual n (%)				
-Zona urbana	49 (98)	12(100)	18(94.7)	18(94.7)
-Zona rural	1 (2)	0	1(5.3)	1(5.3)
Combustible para cocinar n (%)				
-Gas LP	47(94)	12(100)	17(89.4)	18(94.7)
-Aceite y combustible	3(6)	0	2(10.6)	1(5.3)
Vive acerca de alguna industria n (%)				
-Gasolinera	16(32)	3(25)	6(31.8)	7(36.8)
-Térmica	1(2)	0	0	1(5.3)
-Cementera	1(2)	0	1(5.3)	0
-Ladrillera	3(6)	1(8.3)	1(5.3)	1(5.3)
-Industria	6(12)	2(16.6)	2(10.6)	2(10.6)
-Estable	2(4)	2(16.6)	0	0
-Fundidora	2(4)	0	0	2(10.6)
-Maquiladora	2(4)	0	1(5.3)	1(5.3)
-Ninguna de las anteriores	17 (34)	4 (33.3)	8 (42.10)	5 (26.5)

T student, Fisher test \* $p<0.05$  (Grupo de fumadores, fumadores pasivos vs grupo de no fumadores)

El 28% (14 sujetos) de la población total vive cerca de donde desechan o queman basura (a menos de 1000 metros), de ellos, el 35.7% y el 50%, pertenecen a los grupos de exposición al humo de segunda mano y al de fumadores, respectivamente. Las personas que practican actividades físicas al aire libre, y que además, las realizan en zonas con alto tránsito vehicular son, en su mayoría fumadores activos ( $p<0.05$ ). El promedio de personas que habitan en la vivienda de la población total fue de 2.76 esto significa que por vivienda viven aproximadamente tres personas. En el grupo de los alumnos fumadores pasivos se encontró que el 52.6% mantenían una convivencia con personas fumadoras activas en el hogar (Tabla 2). Otro tipo de exposición al tabaco de segunda

mano fue reportada en las reuniones sociales con amigos y otros familiares (Dato no presentado). El 37% de los fumadores se exponen también al humo de segunda mano (Tabla 2).

25 hombres, el promedio de edad es de  $20.32 \pm 1.62$ . En este estudio, se observó que la población masculina son los que presentan un mayor índice de tabaquismo. Numerosas investigaciones demuestran que los hombres y las mujeres difieren en su comportamiento tabáquico. Por ejemplo, las mujeres fuman menos cigarrillos por día, tienden a usar cigarrillos con un contenido menor de nicotina y no inhalan tan profundamente como los hombres (National Institute on Drug Abuse, 2010). Por otro lado, los fumadores activos son los que realizan más actividades, como ejercicio al aire libre, presentan por lo tanto presentan un mayor riesgo de tener altos niveles de COHb. Terashima *et al.*, (2013) Determinaron el grado de contaminación por monóxido de carbono en corredores aficionados de áreas urbanas y su variación al correr en horarios de alto y bajo tránsito vehicular. En el horario de alto tránsito vehicular se encontró una variación de COHb estadísticamente significativa (de 0,44% a 0,54%,  $p=0,039$ ). Este estudio demuestra un aumento en los niveles de COHb durante el horario de alto tránsito vehicular. La encuesta nacional de adicciones en el 2011 estima el 27.7% de prevalencia global de fumadores activos en nuestro país, la Secretaría de Salud reporta que según la edad y escolaridad, para un grupo de 18 a 29 años de edad con escolaridad de secundaria la prevalencia de tabaquismo fue de 35% (Secretaría de Salud, 2011), en nuestro estudio se encontró una prevalencia similar del 38%. De acuerdo a Kuri-Morales *et al.*, (2006) los adolescentes fumadores consumen sólo 1-5 cigarros cada día, mientras en nuestro grupo de edad reportado en este trabajo el rango de cigarrillos consumidos en nuestro grupo de fumadores fue de 1-3. Mientras tanto, en el grupo de los fumadores pasivos se reportó un mayor número de personas fumadoras viviendo en el mismo hogar, esto podría explicar parcialmente los problemas que presenta este grupo en cuanto a los niveles de COHb que son superiores al resto de los grupos. La prevalencia de tabaquismo pasivo en nuestra población estudiada fue de 26%. Morales *et al.*, (2006) reportó para el 2002 que los fumadores pasivos en nuestro país representaron sólo 36.1%, observándose ligeramente mayor a la prevalencia encontrada en nuestra población. En el grupo de fumadores y fumadores pasivos reportaron síntomas relacionados con la exposición a COHb, principalmente mareos y dolores de cabeza (Datos no presentado). Zaragozano *et al.*, (2005) reportaron en un estudio previo que la población expuesta a CO a través de inhalaciones de gas, de la combustión de carbón, butano y propano. Presentan síntomas digestivos (náuseas, vómitos y dolor abdominal) y de tipo neurológico (mareos, cefaleas y alteraciones del nivel de conciencia). Como anteriormente se ha mencionado, el grupo de fumadores pasivos presentó los mayores niveles de COHb, tal observación puede ser

niveles de hemoglobina y hematocrito, tal como está reportado en la literatura, donde el organismo busca una tener una mayor oxigenación en la sangre. Además, el humo respirado de corriente secundaria, generalmente presenta más cantidad de CO, amoniaco ( $\text{NH}_3$ ), nitrosaminas y acroleína; esto hace que los compuestos lleguen a proporciones más profundas del sistema broncopulmonar.

### Conclusión.

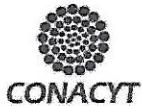
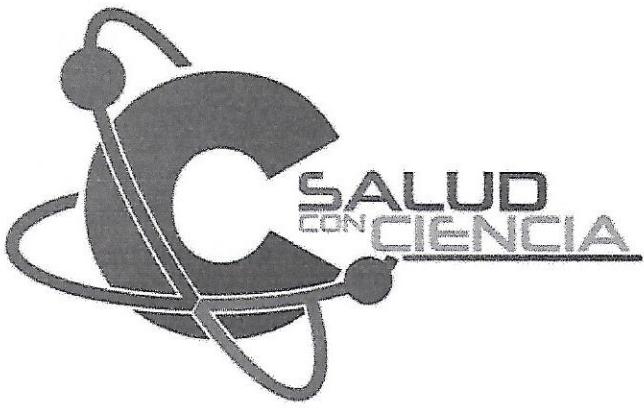
En el presente estudio se observó que la población fumadora pasiva presentó el mayor %COHb. Posiblemente las personas fumadoras pasivas no muestran activado de manera constante su mecanismo de desintoxicación a comparación de las personas fumadoras activas, ellos, por su consumo constante de cigarrillos exhibe un mecanismo de desintoxicación activo y constante, además de que las células ejercen un mayor trabajo para equilibrar el oxígeno presente.

### Conflictos de interés.

Los autores del presente artículo declaran que no existe algún conflicto de intereses para la publicación en la revista.

### Referencias.

- Beutler E., West C. 1984. Simplified Determination of Carboxyhemoglobin. *Clin Chem.* Jun;30(6):871-4.
- Encuesta Nacional de Adicciones. 2011. [http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/ENA\\_2011\\_DRO\\_GAS\\_ILICITAS\\_.pdf](http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/ENA_2011_DRO_GAS_ILICITAS_.pdf)
- Encuesta de Tabaquismo en Jóvenes. 2011. [http://media.controltabaco.mx/content/productos/ETJ/ETJ\\_2011.pdf](http://media.controltabaco.mx/content/productos/ETJ/ETJ_2011.pdf)
- Kuri-Morales PA., González-Roldán JF., Hoy MJ., Cortés-Llanes J., Ramos A., Reynales L., Sáenz de Miera B., Waters H. 2009. Proposal to Increased Cigarettes Taxes. Mexico City: Mexico Report of a Working Group. NIH 2010. National Institute on Drug Abuse (2010). <https://www.drugabuse.gov/es/publicaciones/serie-de-reportes/adiccion-al-tabaco/hay-diferencias-entre-los-sexos-al-fumar-tabaco>
- OMS 2003. Informe Sobre la Salud en el Mundo 2003. Forjemos el Futuro [http://www.who.int/whr/2003/en/whr03\\_es.pdf](http://www.who.int/whr/2003/en/whr03_es.pdf)
- Ramírez, M. 2006. Epidemiología del tabaquismo en México. *Salud Pública de México*, 48, s91-s98.
- Secretaría de Salud Pública (2011) en línea Text: info [México], [2011] [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/tabaquismo.pdf](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/tabaquismo.pdf)



REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA DE DURANGO  
VOLUMEN 1, COMPLEMENTO NO 1, JULIO – DICIEMBRE 2017  
ÓRGANO OFICIAL DE LA SECRETARÍA DE SALUD DE DURANGO

Memorias de la  
**I Jornada Nacional  
de Investigación en Salud**  
Durango 2017

## Contenido

Editorial, pág. 3  
Investigación básica, pág. 6

Investigación Clínica, pág. 25

Investigación en Biotecnología e Innovación, pág. 83

Investigación en Ciencias Sociales y Humanidades, pág. 96

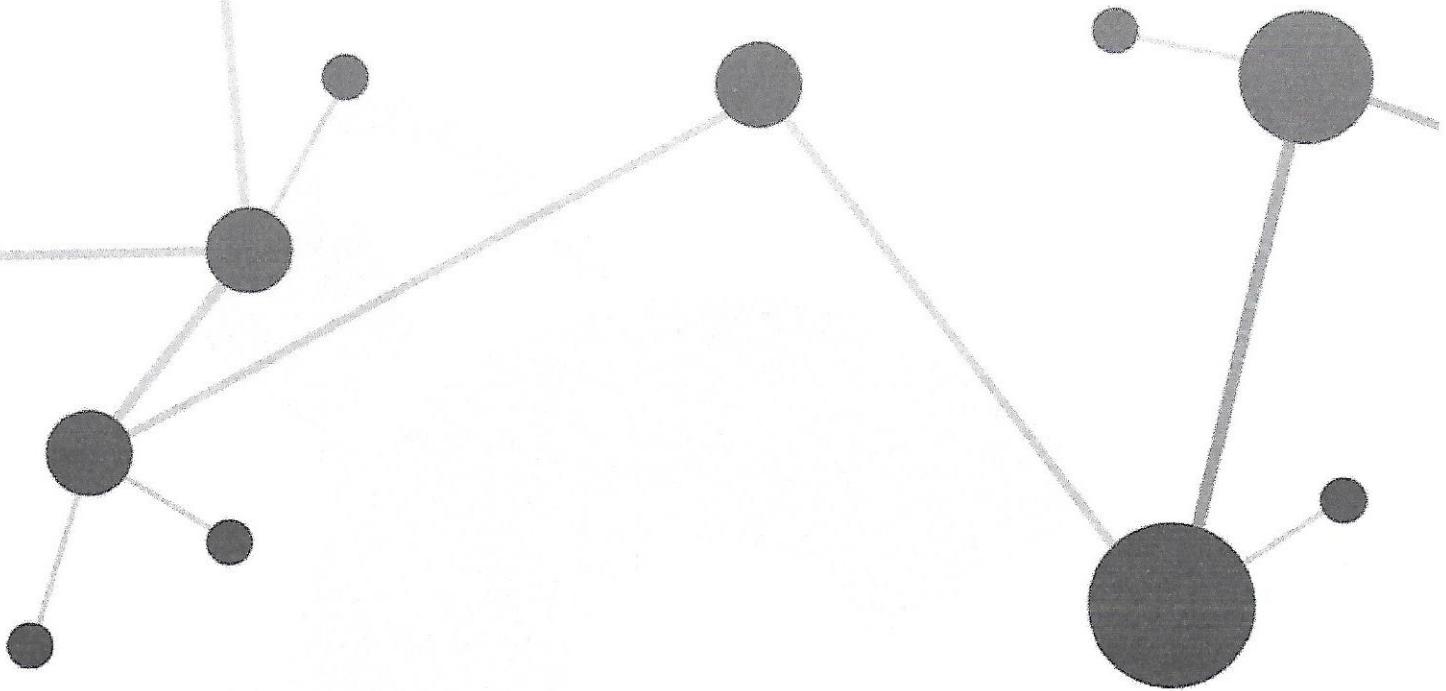
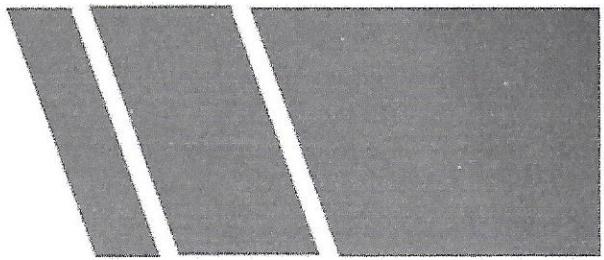
Investigación en salud pública, pág. 120

Casos clínicos, pág. 177

<http://salud.durango.gob.mx/es/saludconciencia>



# INVESTIGACIÓN CLÍNICA



JN-CAR-IC-51.

## VARIACIÓN GENÉTICA DE LOS RECEPTORES CHRNA3 (RS1051730) Y CHRNA5 (RS16969968), SU IMPLICACIÓN EN LA DEPENDENCIA A LA NICOTINA Y SU ASOCIÓN CON CANCER PULMONAR Y EPOC.

**Rebeca Pérez-Morales<sup>1</sup>, María Fernanda González-Delgado<sup>1</sup>, Alberto González-Zamora<sup>2</sup>, Esperanza Y. Calleros Rincón E.<sup>1</sup>, Edgar H. Olivas Calderón<sup>1</sup>, Ollin Celeste Martínez-Ramírez<sup>3</sup>, Julieta Rubio<sup>4</sup>.**

1. Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Juárez del Estado de Durango. . \*rebecapms@ujed.mx 8712602552

2. Laboratorio de Biología Evolutiva. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez del Estado de Durango.

3. Facultad de Nutrición. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

4. Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

### INTRODUCCIÓN.

El tabaquismo es un problema de salud pública, a nivel mundial. La expresión y variación genética en los receptores CHRNA3, CHRNA5 y CHRN4 desempeñan un papel crítico en la adicción a la nicotina y enfermedades asociadas. Objetivo. Caracterizar los polimorfismos CHRNA3 rs1051730 y CHRNA5 rs16969968 en población mestiza mexicana, correlacionar con el nivel de tabaquismo y su asociación con cáncer de pulmón y EPOC.

### MATERIALES Y MÉTODOS.

Se obtuvieron 312 muestras de individuos clínicamente sanos, 74 casos de cáncer de pulmón y 117 casos de EPOC. El genotipado se realizó utilizando sondas TaqMan. Los datos se analizaron mediante regresión logística.

### RESULTADOS.

Los polimorfismos CHRNA3 rs1051730 y CHRNA5 rs16969968 se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg; la frecuencia del alelo A fue de

0.15, para ambos polimorfismos. La población se estratificó en fumadores (61.6%) y no fumadores (38.4%). No se encontró diferencia significativa en la comparación de frecuencias genotípicas en ambos grupos ( $p=0.7$ ). Al estratificar el grupo de fumadores se encontró un  $OR=2.36$  ( $p=0.05$ ) para CHRNA3 rs1051730 y un  $OR=2.69$  ( $p=0.02$ ) para CHRNA5 rs16969968, en el alelo de riesgo A. Los polimorfismos CHRNA3 rs1051730 y CHRNA5 rs16969968 se asociaron con el riesgo a cáncer pulmonar ( $OR=2.15$ ,  $p=0.02$  y  $OR=2.04$ ,  $p=0.03$ , respectivamente) y con EPOC ( $OR=1.94$ ,  $p=0.004$  y  $OR=1.82$ ,  $p=0.008$ , respectivamente).

### CONCLUSIÓN.

Los polimorfismos CHRNA3 y CHRNA5 están asociados con dependencia a la nicotina, cáncer pulmonar y EPOC.

### PALABRAS CLAVE.

Adicción a la nicotina, susceptibilidad genética, CHRNA3 y CHRNA5, cáncer de pulmón, EPOC.



# REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, UJED



Número 6  
Volumen 1  
Octubre 2017

**SÍCQ** 2017  
Ciencia, Ingeniería y Salud  
11º SIMPOSIO INTERNACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICAS

# REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

## CINTILLO LEGAL

Revista Mexicana de Industria y Salud, año 3 No. 6 (Mayo-Octubre), es una publicación semestral editada por la Universidad Juárez del Estado de Durango a través de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicada en Av. Artículo 123 S/N Colonia Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010. Tel (871) 7158810 ext. 118, [www.fcqgp.ujed.mx](http://www.fcqgp.ujed.mx), [editorremdis@gmail.com](mailto:editorremdis@gmail.com), [www.simposiumfcqujed@gmail.com](mailto:www.simposiumfcqujed@gmail.com). Editor responsable: M. C. Mónica Andrea Valdez Solana.

Reserva de derechos al uso exclusivo (en trámite), ISSN (en trámite), ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Lic. Luis Antonio Montoya Jáquez, Departamento de Informática de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicado en Av. Artículo 123 S/N Col. Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010, fecha de última actualización 30 de octubre de 2017.

### Consejo Editorial

Juan Pablo Pardo Vázquez

Bioquímica; Facultad de Medicina, UNAM

Oscar Flores Herrera

Bioquímica; Facultad de Medicina, UNAM

Blanca Miriam Torres Mendoza

Epidemiología; Centro Investigación Biomédica de Occidente, IMSS

Luis Eduardo Figuera Villanueva

Medicina Molecular; Centro Investigación Biomédica de Occidente, IMSS

Ethel Awilda García Latorre

Inmunología, ENCB, IPN

Jaime Héctor Gómez Zamudio

Farmacéutica; Centro Médico Nacional, Siglo XXI

Carlos Regalado González

Biotecnología de Alimentos;

Universidad Autónoma de Querétaro

Francisco Ruiz Terán

Biotecnología de Alimentos; Facultad de Químicas, UNAM

Graciela Castro Escarpulli

Microbiología; Depto. Bacteriología médica, ENCB IPN

Jorge Alberto González Merchand

Microbiología; Dpto. Microbiología Molecular, ENCB IPN

### Director editorial

Mónica Andrea Valdez Solana

### Asistencia editorial

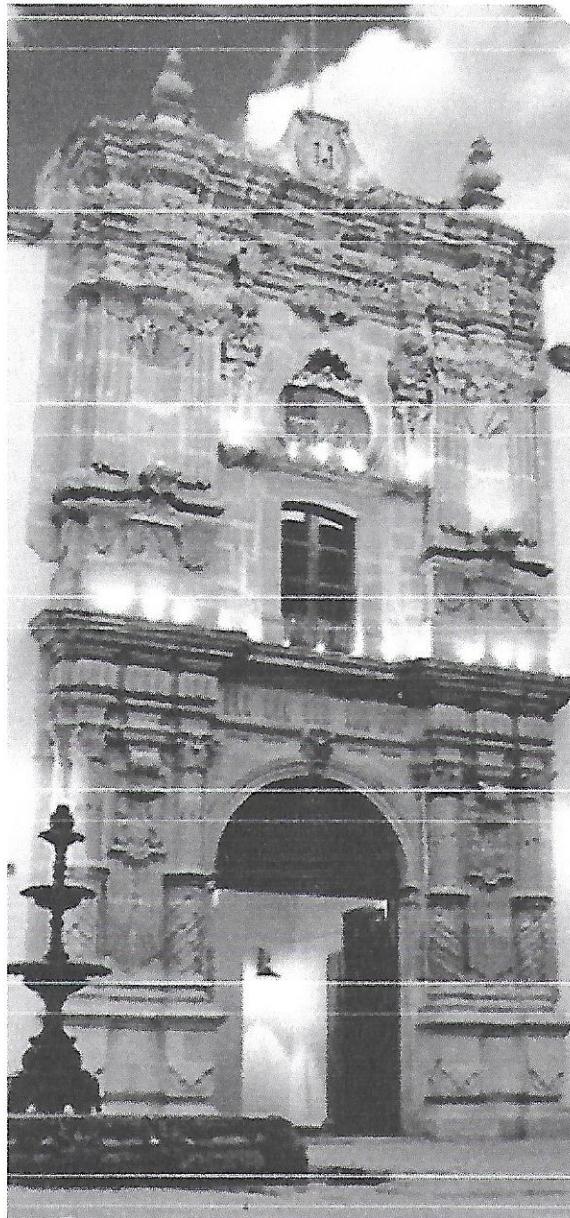
Francisco Carlos López Márquez

Juan José Martínez García

Erick Sierra Campos

### Diseño

Luis Antonio Montoya Jáquez



## DIRECTORIO INSTITUCIONAL

C.P.C y M.I. Oscar Erasmo Návar García  
**Rector**

M.E.C. María de Lourdes Napoles Orrante  
**Secretario General**

Dr. Víctor Manuel Rodríguez González  
**Director de la Facultad de Ciencias Químicas GP**

Dr. Omar Alonso López  
**Secretario Administrativo**

Ing. Alma Alejandra Peralta Caballero  
**Secretario Académico**

M.C. Mónica Andrea Valdez Solana  
**Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación**

Dra. Ruth Elizabeth Alanis Bañuelos  
**Coordinadora Interna de la Maestría en Ciencias Químicas**

Dra. Concepción García Luján  
**Coordinadora de Investigación**

Dr. Juan José Martínez García  
**Coordinador Académico**

## CONTENIDO

EDITORIAL.....	viii
- La ciencia en México	

LA EVOLUCIÓN DE LOS ORGANISMOS.....	x
-------------------------------------	---

Alejandra de Jesús Zámago Amaro; Luz Andrea García de la Torre; Mónica Andrea Valdez Solana; Erick Sierra Campos

INVESTIGACIONES.....	3
----------------------	---

- Efecto de la <i>Moringa oleifera</i> sobre la función mitocondrial en corazón de ratas diabéticas.	
--	--

Flores-Molina Loammi Ismael, Sánchez-Muñoz María Alejandra, Valdez-Solana Mónica Andrea, García-Arenas Guadalupe, Sierra-Campos Erick.

- Evaluación cinética de la bioconversión de Fumarato de amonio en aminoácido L- aspártico por la enzima aspartasa en extracto crudo.	
---	--

Alvarado Pérez Fernanda, Luévanos Escareño Miriam Paulina, Patricia Berenice Loera Valenzuela, Salvador Pérez Flores y Nagamani Balagurusamy.

ALIMENTOS.....	6
----------------	---

- Determinación de metabolitos secundarios mediante pruebas colorimétricas y HPLC en diferentes estructuras y etapas de desarrollo de <i>Physalis ixocarpa</i> y <i>Physalis angulata</i> .	
---	--

Cobaleda-Velasco Marcos, Alanis-Bañuelos Ruth Elizabeth, Almaraz-Abarca Norma, Villa-González Olga Yakemi, Arellano-Murillo Carolina, García-Lujan Concepción

- Propiedades físicas, funcionales y compuestos fenólicos de seis variedades de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	
---	--

Ríos-Romero Karen Itzel, Cobaleda-Velasco Marcos, Alanis-Bañuelos Ruth Elizabeth, Rosales-Serna Rigoberto, Jiménez-Ocampo Rafael, Jacobo-Salcedo María del Rosario

- Determinación de metabolitos secundarios y capacidad antioxidante en <i>Silybum marianum</i> y tres especies de <i>Cirsium</i> .	
--	--

Alanis-Bañuelos Ruth Elizabeth, Cobaleda-Velasco Marcos, Arellano-Murillo Carolina, Villa-González Olga Yakemi, Avalos-Valerio Gael Sinhué, García-Lujan Concepción

- Determinación de propiedades antioxidantes de la cáscara, la membrana carpelar y la semilla, frescas y secas de la granada ( <i>Punica granatum</i> ) de una empresa de la Comarca Lagunera.	
--	--

Alanis-Bañuelos Ruth Elizabeth, Ríos-Martínez Francisco Miguel, Espinoza-Romero Jennifer Holanda, Arellano-Murillo Carolina, Villa-González Olga Yakemi, García-Lujan Concepción

- Uso combinado de ácido cáprico y ácido láurico por medio de metodología de superficie de respuesta para la inhibición <i>in vitro</i> de <i>Candida albicans</i> .	
--	--

Meza-Velásquez Francisco, Pineda-Escareño, María Guadalupe, Flores-Fraire Gerardo, Esparza-Rivera Juan Ramón, Flores-Loyola Erika y Meza-Velázquez Jorge Armando

- Contenido de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en maíz ( <i>Zea Mays L.</i> ) rojo sometido a proceso de nixtamalización asistido con ultrasonido.	
---	--

Mota Ituarte María del Socorro, Candelas Cadillo María Guadalupe, Martínez García Juan José, Quintero Ramos Armando, Aguilera Ortiz Miguel.

- Capacidad antioxidante, fenoles y antocianinas en harina de maíz ( <i>Zea Mays L.</i> ) pigmentada nixtamalizada.	
---	--

Enríquez Márquez Andrea Guadalupe, Romero Romero Pablo Ignacio, Reza Vargas María del Carmen, Aguilera Ortiz Miguel.

- Conservación de la calidad comercial de guayaba ( <i>Psidium guajava</i> ) por aplicación de un recubrimiento a base de alginato de sodio.	
--	--

Luna Zapién Edén Areli, Reyes Avalos María Concepción, Minjares Fuentes José Rafael, Miguel Aguilera Ortiz, Meza Velázquez Jorge Armando.

- Propiedades fisicoquímicas, funcionales y sensoriales de un reestructurado cárneo adicionado con harina de lenteja ( <i>Lens culinaris</i> ) gelificado mediante transglutaminasa microbiana.	
---	--

Martínez Gutiérrez Laura Cecilia, Esparza Rivera Juan Ramón, Meza Velázquez Jorge Armando, Aguilera Ortiz Miguel, Ortega Valdez Karla.

- La Ruta del Shikimato como blanco para el diseño de fármacos antibacterianos.	
---	--

Téllez Valencia Alfredo, Favela Candia Alejandro, Enríquez Mendiola Daniel, Chaidez Avila Alondra, Campos Almazan Mara Ibeth, Betancourt Conde Irene, Vázquez Raygoza Alejandra, Sierra-Campos Erick, Valdez-Solana Mónica Andrea, Avitia Domínguez Claudia Isela.

- Concentración de arsénico y flúor en el agua de bebida en el ejido pastor Rouaix de Gómez Palacio, Dgo.	
---	--

Duarte Sustaita Jesús Jaime, Perales Yañez Luis Fernando, García Vargas Gonzalo Gerardo

- Interacciones medicamentosas más frecuentes en el servicio de trasplante de médula ósea de un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México.	
--	--

De la Cruz Morales Eugenia, Araujo López Déborah, Castillo Vázquez Carlos, Calleros Rincón Esperanza, Pérez Morales Rebeca, Olivias Calderón Edgar

- Determinación y comparación de las propiedades antioxidantes, fenoles totales, flavonoides totales de ocho presentaciones herbolarias de *Silybum marianum* y la semilla de *Silybum marianum*.

Alanis-Bañuelos Ruth Elizabeth, Cobaleda-Velasco Marcos, Nava-Ruvalcaba Gabriela del Carmen, Jurado-Pérez Margarita, Correa-Maldonado Julián, Juárez-Navarro Karen Jacqueline

- Concentraciones de PCBs en suelo en diferentes zonas de la Comarca Lagunera.

Hernández González Sandra-Isabel, Martínez Romero Aurora, Lozoya Enríquez Francisco Javier, Alba Romero José de Jesús, Olivas Calderón Edgar Héctor Ortega Sánchez José Luis, Recio Vega Rogelio.

- Incidencia de brucelosis en derechohabientes de la clínica hospital ISSSTE Gómez Palacio, Durango.

Martínez-Romero Aurora, Ortega-Sánchez José Luis, Hernández-González Sandra Isabel, Alba-Romero José de Jesús

- Desarrollo de biosensores enzimáticos para detección de plaguicidas organofosforados.

Galindo-Guzmán Magdalena, Pineda-Escareño María Guadalupe, Alma Patricia Galindo Guzmán, Flores-Loyola Erika

- Inducción de actividad  $\beta$ -lactamasa de amplio espectro en células de *Pseudomonas aeruginosa*.

Flores-Loyola Erika, Mariana Angélica Triana Rojas, Meza-Velázquez Francisco, Pineda-Escareño María Guadalupe

- Validación de un método analítico para la determinación de cloruro de sodio en solución inyectable.

Rodríguez-Avalos Gissela, Lozano-Moran Martín, Alanis-Bañuelos Ruth Elizabeth, García-Luján Concepción, Castro-Barraza Fernando, Cobaleda-Velasco Marcos

- Determinación de las etapas de crecimiento de *Bacillus cereus* para la producción de aminoácido L-aspártico.

Patricia Berenice Loera Valenzuela, Miriam Paulina Luévanos Escareño Fernanda Alvarado Pérez, y Nagamani Balagurusamy

- Cinéticas de degradación de fenol a partir de cepas aisladas de lodo residual.

Pérez Flores Salvador, Luévanos Escareño Miriam Paulina, Alvarado Pérez Fernanda, Balagurusamy Nagamani, Ávila Alvarez Cassandra Tubagueisy.

- Evaluación *in vitro* de la actividad antiviral de extractos de Neem (*Azadirachta indica*) en la replicación de VIH-1 en cultivos celulares.

Pedroza-Escobar David, Barboza-Herrera Carolina, Vega-Menchaca María del Carmen, Serrano-Gallardo Luis Benjamín

- Evaluación de la actividad adyuvante-inmunológico de extractos de plantas medicinales (*Azadirachta indica A. Juss.*).

Barboza-Herrera Carolina, Pedroza-Escobar David, Serrano-Gallardo Luis Benjamín, Vega-Menchaca María del Carmen

## CIENCIAS BIOMÉDICAS.....

42

- Evaluación de la actividad de la enzima nitrato reductasa en células mononucleares de cabras expuestas a la vacuna BCG.

López Sánchez Cesar Abel, Cervantes Nájera Bianca Abigail, Martínez Romero Aurora

- Identificación de errores de medicación más comunes en niños hospitalizados en un instituto de alta especialidad en la Ciudad de México.

Castillo Vázquez Carlos, Nieto Rodríguez Alejandro, De la Cruz Morales Eugenia, Calleros Rincón Esperanza, Pérez Morales Rebeca, Olivas Calderón Edgar

- Actividad hipoglucemiente de la infusión de hierba de la golondrina (*Euphorbia prostrata*) y de huevo de venado (*Periocereus gregii*) en un modelo de ratas diabéticas inducidas con aloxano.

Ortiz Carrillo Cristina Alcibi, Sáenz Esqueda María de los Ángeles, Alanis Bañuelos Ruth Elizabeth, Castro Barraza Fernando, García Luján Concepción

- Evaluación del desempeño los métodos inmunocromatográfico comparados con inmunofluorescencia e inmunoensayo enzimático para el diagnóstico de enfermedad de Chagas.

Alba R. J. Jesús, Hernández González Sandra Isabel, Martínez-Romero Aurora, Alba-Romero José de Jesús

- Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de plasma rico en plaquetas de en cepas de *Acinetobacter baumannii*.

Vázquez-Galindo David F; Hernández-González Sandra Isabel; Martínez-Romero Aurora; Alba-Romero José de Jesús

- Riesgo de contraer miasis ocular por *Oestrus Ovis* (L.) de ganado caprino en la Comarca Lagunera de Durango.

Ortega-Sánchez José Luis, Estala-Duran Alma Isabel, Hernández-González Sandra Isabel, Alba-Romero José de Jesús, Martínez-Romero Aurora

- Incidencia de enfermedades infecciosas en donadores de sangre del Hospital General de Zona No. 46 del IMSS de Gómez Palacio Dgo.

Esquivel García Diana, Espino Ortiz Jesús Rafael, Espino González Jesús Rafael, Nuñez Pérez Jorge, Aguilar Valenzuela Jorge, García Luján Concepción.

- Interacción de los receptores de leptina y la administración intraperitoneal de un precursor de 5- hidroxitriptófano en animales de experimentación.

Lara Medina César, Pedroza Escobar David, Téllez López Miguel Ángel, Vega Menchaca María del Carmen, Serrano Gallardo Luis Benjamín

## MICROBIOLOGÍA.....

53

- Detección de *E. coli* O157:H7 enterohemorrágica en muestras de heces fecales *Staphylococcus aureus*.

Pantoja-Ramírez A.G., González-Yáñez M.G.E., Saenz-Esqueda M de los A., Alanis-Bañuelos R.E., Castro-Barraza F., García-Luján C.

- Evaluación de la capacidad bactericida de diferentes extractos de *Moringa oleifera* sobre cepas gram negativas resistentes de origen aviar.

Flores Pruneda Rosa Elena, Adame Cardoza Ana Karen, Sierra-Campos Erick, Valdez-Solana Mónica Andrea

- Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales de sangre de grado (*Jatropha dioica*) y olivo (*Olea europaea*) ante especies de *Candida* spp hospitalarias.

Jaramillo Nevárez Deniss Guadalupe, Jaramillo Nevárez Yareli, Ruth Elizabeth Alanis Bañuelos, Miguel Angel Téllez López, Fernando Castro Barraza, Concepción García Luján

# Interacciones medicamentosas más frecuentes en el servicio de trasplante de médula ósea de un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México.

De la Cruz Morales Eugenia<sup>1</sup>, Araujo López Déborah<sup>2</sup>, Castillo Vázquez Carlos<sup>1</sup>, Calleros Rincón Esperanza<sup>1</sup>, Pérez Morales Rebeca<sup>1</sup>, Olivas Calderón Edgar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas unidad Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango. Avenida Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango.

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Pediatría. Insurgentes Cuicuilco 4530, Ciudad de México.

**Introducción:** actualmente es necesario el incremento de los esfuerzos de las autoridades encargadas de vigilar la calidad e inocuidad de los productos farmacéuticos. La interacción medicamentosa o farmacológica se produce cuando la actividad o el efecto del fármaco se ven alterados por la presencia o por la acción de otro. **Objetivo:** identificar las principales interacciones medicamentosas que se presentan en el servicio de trasplante de médula ósea para prevenir y reducir su incidencia. **Materiales y métodos:** se realizó un seguimiento farmacoterapéutico en el servicio de trasplante de médula ósea durante los meses de enero a junio del 2017 en 30 pacientes pediátricos con edades desde 6 meses hasta 17 años. Se revisaron las interacciones medicamentosas del servicio de trasplante de médula ósea en un hospital de tercer nivel de la Ciudad de México. Se clasificaron las interacciones medicamentosas en interacción fármaco-fármaco, fármaco-nutriamento e incompatibilidad intravenosa. **Resultados:** se reportaron 382 interacciones medicamentosas, de las cuales 359 fueron fármaco – fármaco siendo las principales *Omeprazol* con *Fluconazol*, *Micofenolato*

con *Aciclovir* y *Omeprazol* con ciclosporina, mientras que 9 fueron fármaco - nutriamento, el *Imatinib* e *Itraconazol* necesitaban pH en especial y 14 correspondieron a una incompatibilidad intravenosa, el medicamento que presentó más incompatibilidades intravenosas fue el *Ondansetron* con *Cefepime*, *Meropenem* y *Bicarbonato de Sodio*. También se logró identificar los principales medicamentos que propician la interacción fármaco - fármaco destacando el *Omeprazol*, el *Micofenolato* y el *Fluconazol* donde la interacción medicamentosa principal fue la interacción farmacocinética, en especial alteración a nivel de la absorción y metabolismo del fármaco. **Conclusión:** es necesario el seguimiento farmacoterapéutico en los pacientes polimedificados. Con el trabajo en conjunto de médicos, farmacéuticos y personal de enfermería se podrá reducir el número de interacciones medicamentosas.

**Palabras clave:** farmacia hospitalaria, seguimiento farmacoterapéutico, interacciones medicamentosas.

# Identificación de errores de medicación más comunes en niños hospitalizados en un instituto de alta especialidad en la Ciudad de México

Castillo Vázquez Carlos<sup>1</sup>, Nieto Rodríguez Alejandro<sup>2</sup>, De la Cruz Morales Eugenia<sup>1</sup>, Calleros Rincón Esperanza<sup>1</sup>, Pérez Morales Rebeca<sup>1</sup>, Olivas Calderón Edgar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas unidad Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango. Avenida Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Durango.

<sup>2</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Avenida Universidad 1001, Cuernavaca Morelos.

\*Correo electrónico: eholivas27@gmail.com

**Introducción:** la farmacia hospitalaria es una especialidad que se ocupa de servir a la población en sus necesidades farmacoterapéuticas a través de la selección, preparación, adquisición, control de dispensación e información de medicamentos y otras actividades orientadas a conseguir una utilización apropiada, segura y efectiva de los tratamientos en beneficio de los pacientes atendidos en el hospital y en su ámbito de influencia. Un error de medicación se puede definir como cualquier incidente prevenible relacionado con la administración inapropiada de los medicamentos que conlleva un daño o una acción terapéutica disminuida en los pacientes, aun cuando las prescripciones están bajo el control de los profesionales de la salud. **Objetivo:** Identificar los principales y más frecuentes errores de medicación en niños atendidos en diferentes servicios hospitalarios de un centro médico de tercer nivel localizado en la Ciudad de México. **Materiales y métodos:** se realizó un perfil de seguimiento farmacoterapéutico durante los meses de enero a junio del 2017 en pacientes pediátricos con edades desde 6 meses hasta 17 años, apoyado en el "Manual de Prescripción Pediátrica, 14<sup>a</sup> Edición,

del autor Carol K. Taketomo" para la búsqueda de posibles interacciones e incompatibilidades entre medicamentos administrados a través de diferentes vías. **Resultados:** en este estudio se encontró que un tercio de la población hospitalizada presentó fallos en la prescripción. Se contabilizó un total de 1047 errores, de los cuales, 524 de ellos correspondían a interacciones fármaco-fármaco. Se encontró altas frecuencias de errores de medicación en pacientes entre 1 y 2 años de edad, aunado a esto, en el servicio de trasplante de medula ósea, se observó el mayor número de fallas en la medicación en relación a su población, alrededor de 13 por cada paciente. **Conclusión:** se encontró una alta frecuencia de errores farmacoterapéuticos en la población de estudio, por lo que consideramos importante y necesario el apoyo de los profesionales farmacéuticos como parte del equipo de salud dentro de los servicios hospitalarios y comunitarios que contribuya con la detección oportuna de posibles errores de prescripción y/o en los tratamientos médicos.

**Palabras clave:** farmacia hospitalaria, errores de medicación, pacientes pediátricos.



REVISTA DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA DE DURANGO  
VOLUMEN 1, COMPLEMENTO NO 1, JULIO – DICIEMBRE 2017  
ÓRGANO OFICIAL DE LA SECRETARÍA DE SALUD DE DURANGO

Memorias de la  
**I Jornada Nacional  
de Investigación en Salud**  
Durango 2017

## Contenido

- Editorial, pág. 3
- Investigación básica, pág. 6
- Investigación Clínica, pág. 25
- Investigación en Biotecnología e Innovación, pág. 83
- Investigación en Ciencias Sociales y Humanidades, pág. 96
- Investigación en salud pública, pág. 120
- Casos clínicos, pág. 177

<http://salud.durango.gob.mx/es/saludconciencia>



# INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA



JN-CAR-ISP-30.

## IMPACTO DE LOS NITRATOS EN LA REPRODUCCIÓN FEMENINA

Calleros-Rincón Esperanza Yasmin<sup>1</sup>, Pérez-Morales Rebeca<sup>1</sup>, Gendarilla-Esparza Diana Dennys, Olivas-Calderón Edgar Héctor<sup>1</sup>, Avalos-Calleros Bertha Yasmin<sup>2</sup>.

1. Universidad Juárez del Estado de Durango, Facultad de Ciencias Químicas, Campus Gómez Palacio, Dgo,

2. Universidad Vizcaya de las Américas, Campus Torreón, Coah.

### INTRODUCCIÓN.

La contaminación del agua por N-NO<sub>3</sub>- es un problema, debido a la sobrefertilización y el mal manejo de las excretas de ganado. Éste contaminante es un potencial peligro para la salud debido a la generación de compuestos N-nitrosos que son pro-oxidantes de muchas biomoléculas. El N-NO<sub>3</sub>- al transformarse en nitrito produce metahemoglobinemia y vasodilatación favoreciendo áreas de hipoxia en placenta. Objetivo. Conocer el efecto de los nitratos en la reproducción femenina.

### MATERIAL Y MÉTODOS.

Nuestro estudio analizó 175 mujeres distribuidas en 10 comunidades expuestas al consumo de agua contaminada N-NO<sub>3</sub>- se formaron 3 escenarios alto medio y bajo de acuerdo al nivel mayor de N-NO<sub>3</sub>- fue de 25.2 mg/L, se tomó como biomarcador de exposición sus niveles de metaHb.

### RESULTADOS.

Se observó una diferencia significativa entre los grupos (Kruskal Wallis p= 0.0001), en el TTP fue mayor en el nivel alto de exposición, así como también la presencia de abortos, sin embargo se encontró una alta incidencia de sífilis y gonorrea en el nivel alto en la pareja sexual de las mujeres analizadas.

### CONCLUSIONES.

Es necesario realizar una vigilancia epidemiológica y más estudios para que clarifiquen los diversos efectos adversos a la salud de éste contaminante.

### PALABRAS CLAVE.

Nitratos, agua, abortos, reproducción, Tiempo para embarazo.



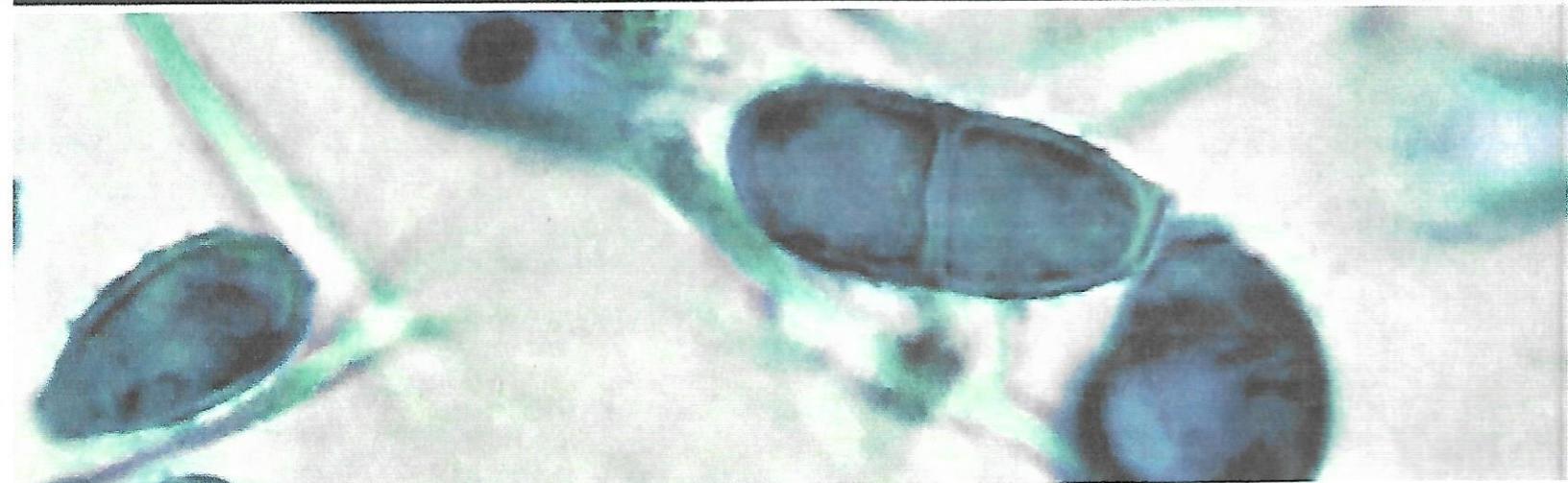
REVISTA CIENTIFICA

# CONAQUIC

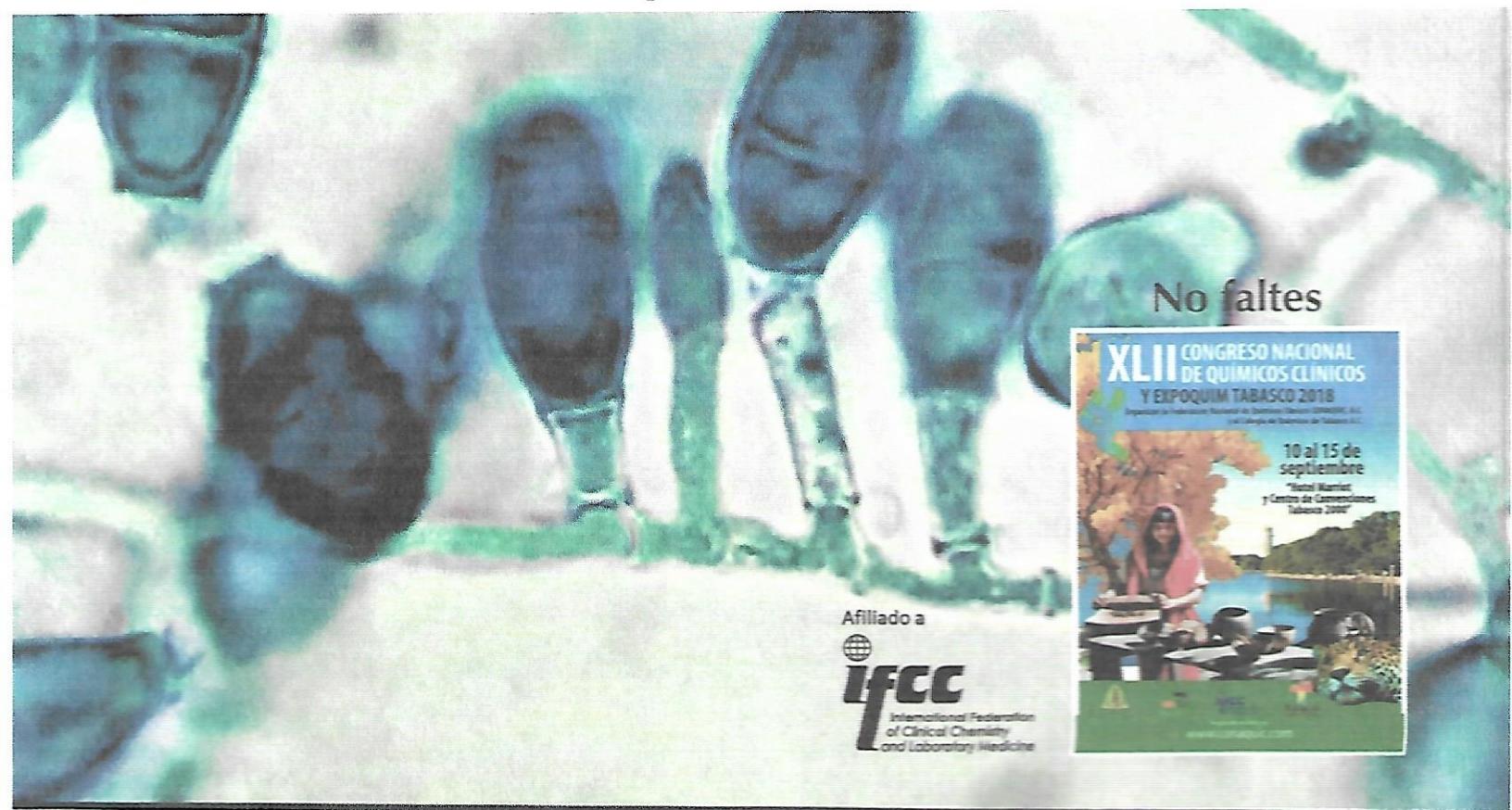
ÓRGANO DE INVESTIGACIÓN Y DIFUSIÓN DE LA FEDERACIÓN NACIONAL DE QUÍMICOS CLÍNICOS CONAQUIC, A.C.

AÑO 24 VOL. 70 JULIO - AGOSTO 2018

ISSN: 2594-0120



Juntos llegamos a la Edición número 70  
**¡Felicitaciones!**



**XLII Congreso Nacional de Químicos Clínicos y ExpoQuim  
Tabasco 2018**



Afiliado a  
**IfCC**  
International Federation  
of Clinical Chemistry  
and Laboratory Medicine

## Consejo Directivo 2017 - 2019

**Presidente**  
M en C. Alejandra Anilben Cano Huizar  
presidencia@conauic.com

**Vicepresidente**  
M en C. Antonio Rascón Careaga  
vicepresidencia@conauic.com

**Secretario**  
Quim. Juan del Toro Herrera  
secretaria@conauic.com  
**Pro secretario 1**  
Quim. Liborio Martínez Cruz  
prosecretaria1@conauic.com  
**Pro secretario 2**  
Quim. Migdalia Nallely Pérez Sanchez  
prosecretaria1@conauic.com

**Tesorera**  
Quim. Carlos May Pech  
tesorera@conauic.com  
**Pro tesorera 1**  
Quim. Glendy Maricela Rosado Herrera  
protesorera1@conauic.com  
**Pro tesorera 2**  
Quim. María América Delgado Herrera  
protesorera2@conauic.com

**Secretario Ejecutivo**  
Quim. Javier Manuel Sedano Millán  
secejecutivo@conauic.com

**Educación Continua**  
Quim. David Gámez Córdova  
educacioncontinua@conauic.com  
**Prosecretario Educación Continua 1**  
Quim. María Ángela Zelene Valerio Naranjo  
proeducacioncontinua1@conauic.com  
**Prosecretario Educación Continua 2**  
Quim. Fernando Ramírez Méndez  
proeducacioncontinua2@conauic.com  
**Prosecretario Educación Continua 3**  
Quim. Valeria Paloma Martínez Sigala  
proeducacioncontinua3@conauic.com

**Secretaría de Vinculación con IFCC**  
Quim. Sol Madrid Castro  
vinculacionifcc@conauic.com

**Laboratorios particulares**  
Quim. Adriana Osiris Méndez Cigarroa  
labsparticulares@conauic.com

**Laboratorios Institucionales**  
QBP. Irma Luz Vega Nava  
labsinstitucionales@conauic.com

**Apoyo y Defensa a Laboratorios**  
Quim. Jorge Suárez Arellano  
M. en C. José de Jesús Carreño Torres  
defensalabs@conauic.com

**Mutualismo**  
Quim. María del Carmen Borda Palmillas  
mutualismo@conauic.com

**Difusión Social y Medios**  
Quim. Mercedes García Rivera  
Quim. Syntia Alejandra Chávez Cosío

**Asuntos Universitarios**  
Quim. Daniel Salazar Ballesteros  
asuntosuniversitarios@conauic.com

TEMÁTICA

SECCIONES

# SUMARIO

AÑO 26 VOL. 70 JUNIO - AGOSTO 2018

En este número encontrarás

- 2 Editorial
- 4 Carta del Presidente

### Artículos originales

- Aislamiento de microorganismos del género *Aeromonas* en pescado para consumo humano en la Comarca Lagunera de Durango. **Pág. 9**
- Obtención y caracterización de células madre mesenquimales a partir de sangre periférica. **Pág. 12**
- Dieta y niveles plasmáticos de Glucosa, Triglicéridos y Colesterol en habitantes de la comunidad de Tinún, Campeche. **Pág. 16**
- Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) contenidas en una comunidad intracelular bacteriana (CIB) uretral. **Pág. 26**
- Prevalencia de Hipotiroidismo en un hospital del sur de Sonora. **Pág. 39**
- Evaluación y comparación de Parasitosis en niños en edad escolar de primer y segundo año en comunidades rurales y urbanas. **Pág. 42**
- Metotrexato: factor coadyuvante de la anemia que altera la reología eritrocitaria. **Pág. 45**
- La hipocalcemia postiroidectomía: incidencia, control y tratamiento. **Pág. 48**
- Estudio de comparación entre dos sistemas de toma de muestra de sangre arterial en el hospital regional general No.1 "Carlos MacGregor Sánchez Navarro" de la Ciudad de México. **Pág. 52**

### Secciones permanentes

- Pág. 6** \*\*Sección Uroanálisis
- Esquema de Control de Calidad Externo, ECCEX, CONAQUIC.
- Pág. 20** \*\*Sección Hemostasia
- La cascada de la coagulación. • Servicio Social CONAQUIC. Diagnóstico por laboratorio de las parasitos intestinales periodo 2016-2017.
- Pág. 28** \*\*Sección Parasitología
- ¿Por qué realizar el examen coproparasitoscópico? Diagnóstico por el laboratorio previo a la prescripción de antiparasitarios.
- Pág. 30** \*\*Sección Uroanálisis
- Califica tus conocimientos.
- Pág. 32** \*\*Sección Hematología
- Leucemia Mieloblástica Aguda con mínima diferenciación, NOS.

- 57 Lecturas Recomendadas

- 54 Cartas al Editor

- Cartel y Programa Preliminar XLII Congreso Nacional de Químicos Clínicos y Expoquim, Tabasco, 2018

- 64 Casas Comerciales

### Consejo Editorial

*Editor responsable:* M.C. Antonio Rascón Careaga

*Participación de Casas Comerciales:* Quim. Alejandra Anilben Cano Huizar, Quim. Carlos May Pech

*Distribución:* M.C. Antonio Rascón Careaga

### Comité Editorial

M.C. Antonio Rascón Careaga, Quim. José Ángel Fco. Flóres Hernández / E.H.D.L. Alejandro Martínez Sánchez / Quim. Javier Manuel Sedano Millán / Quim. David Gámez Córdova

*Diseño Editorial:* D.G. Gabriel Pliego Galarza / M.G.C. Gloria Serrano Solleiro, GRUPO INTERACCIÓN

## Aislamiento de microorganismos del género *Aeromonas* en pescado para consumo humano en la Comarca Lagunera de Durango

José de Jesús Alba-Romero<sup>1,2,4</sup>, Concepción García-Luján<sup>1</sup>, Esperanza Yasmín Calleros-Rincón<sup>1</sup>, Sandra Isabel Hernández González<sup>1</sup>, José Luis Ortega-Sánchez<sup>3</sup>, Aurora Martínez-Romero<sup>1</sup>.

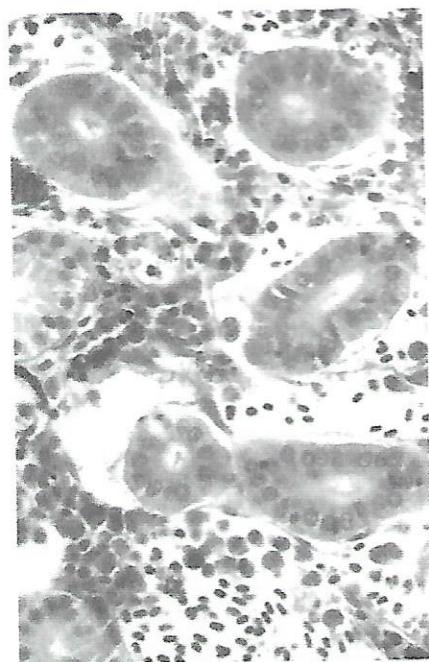
1. División de Estudios de Postgrado e Investigación. Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED).

2. Laboratorio de Asesores Especializados de la Laguna, Gómez Palacio, Durango.

3. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo.

4. Sanatorio San José de Gómez Palacio Durango SA de CV.

\* Artículo ganador en la categoría I durante el Congreso Nacional Mérida 2017



### Resumen

El pescado y los productos de la pesca son una fuente muy importante de nutrientes, especialmente, de proteína para el hombre; sin embargo, las bacterias emergentes de origen acuático, como el género *Aeromonas* representan un factor de riesgo para la salud. Existen reportes de la presencia de *Aeromonas* en pescado, como las truchas procedentes de piscifactorías en México y pescado de un mercado en São Paulo, Brasil donde *Aeromonas* fue la bacteria más frecuentemente aislada. En México está más asociada a padecimientos gastrointestinales, sin embargo actualmente produce cuadros sistémicos principalmente en pacientes inmunosuprimidos. En nuestro estudio se procesaron 130 muestras de pescado para consumo humano en caldo *Aeromonas*, agar Mac Conkey y agar sangre con 20 mg/ml de ampicilina. Se identificaron los microorganismos aislados por el sistema Micros Can4 donde se encontraron Enterobacterias 68%, *Pseudomonas* 9.5%, *Salmonella enterica* 1.5%, *Pleisiomonas* 2.5% y *Aeromonas* 19%. Solo se identificó la especie *hydrophila* debido a la gran diversidad genética, ya que en la actualidad existen más de 32 especies. El hallazgo de *Aeromonas* en pescado de consumo es un indicador epidemiológico de riesgo por lo que se debe hacer énfasis en la búsqueda, aislamiento e identificación.

**Palabras clave.** *Aeromonas*, alimentos contaminados, pescado, factores de virulencia.

### Introducción

El género *Aeromonas* pertenece a la Familia *Aeromonadaceae* e incluye oxidante positivo, facultativamente anaeróbico, bacilos Gramnegativo. Hasta la fecha, se reconocen 32 especies, y 19 hasta ahora han sido implicados en diarrea humana, bacteriemia o infecciones de heridas, y son consideradas como patógenos oportunistas en humanos. Nuevos datos han demostrado que el género *Aeromonas spp.* es un verdadero enteropatógeno (Figueras, M. J., F. 2017). La mayoría de los aislamientos ambientales de *Aeromonas hydrophila* y otras especies de *Aeromonas* relacionados, las cuales secretan una gran cantidad de productos extracelulares, algunos como la areolisina, hemolisina, enterotoxina, proteasa y enterotoxina citolítica son considerados como factores de virulencia en la patogenia.

El grado o intensidad de la patogenicidad de un organismo como es el caso del *Aeromonas* se indica por las tasas de letalidad o la capacidad de invadir los tejidos del huésped y causar enfermedad o la capacidad relativa de un microorganismo para causar enfermedad superando las defensas del cuerpo; la patogenicidad del género *Aeromonas spp.* se basa en la expresión de varios factores de virulencia (Pang, M. 2017).

El hombre, se expone a esta bacteria por el consumo de pescado o de derivados insuficientemente cocidos, o por contaminación cruzada con otros alimentos, agua o materias primas. En el mundo existen reportes acerca de la presencia de *Aeromonas* en pescado. Al analizar trucha procedente de piscifactorías en México, indicaron que *Aeromonas* fue la bacteria más frecuentemente aislada, así como en muestras de pescado procedentes de un mercado en São Paulo, Brasil pudieron recuperar *Aeromonas* en el 50% (William Suárez Q. 2011). Es muy importante realizar la identificación del género *Aeromonas spp.*, ya que algunas de estas especies están aisladas de diversas infecciones humanas. La patogenicidad del género *Aeromonas spp.* se

# ARTÍCULO CIENTÍFICO

basa en la expresión de varios factores de virulencia (Kralova, S. 2016). El género *Aeromonas* está conformado por bacterias ubicuas principalmente recuperadas de los ecosistemas acuáticos. Se encuentran tanto en agua dulce como en aguas estuarias y marinas, y en asociación con numerosos organismos acuáticos autóctonos de estos entornos. Sin embargo, las *Aeromonas* producen enfermedades de los peces (Bartkova, S. 2017).

*Aeromonas spp.* y *P. shigelloides* son importantes agentes patógenos transmitidos por el agua y por los alimentos, que causan diarrea aguda o causan infecciones extraintestinales que afectan a varios órganos internos, así como a la piel y los tejidos blandos. Sin embargo, también *Aeromonas hydrophila* causa grandes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura (Cui, L. 2016). Estas infecciones se describen con más frecuencia en los manipuladores de alimentos y profesionales de la salud (Castelo-Branco, D. 2017).

Los miembros del género *Aeromonas* causan una variedad de infecciones sistémicas en personas inmunocompetentes como inmunocomprometidas debido a su virulencia multifacética, causando también grandes pérdidas económicas en la industria de la acuicultura (Chenia, H. Y. 2017).

## Objetivos

Aislar e identificar microorganismos del género *Aeromonas* en pescado para consumo humano en la Comarca Lagunera de Durango.

1. Obtener pescados extraídos del Río Nazas para consumo humano.
2. Aislar e identificar el género *Aeromonas* por el método del doble paso con APA y agar *Aeromonas*, agar Mac Conkey y agar sangre con 20 mg/L de ampicilina.

## Planteamiento del Problema

El género *Aeromonas* constituye un grupo microorganismos reconocidos como agentes causales de cuadros diarreicos agudos que afecta a humanos, sin embargo en la actualidad se le reconoce como un microorganismo causante de enfermedades sistémicas. A nivel mundial hay evidencia de que afecta a animales, principalmente a peces.

Este hecho afecta a la industria del pescado para consumo humano y constituye un factor de riesgo para el hombre debido a que el género *Aeromonas* está constituido por 32 especies de distribución amplia en el medio ambiente. Por lo que se hace necesario el aislamiento de microorganismos del género *Aeromonas* en pescado para consumo humano en la Comarca Lagunera de Durango, debido a que en México no existen estudios de correlación entre el microorganismo, enfermedades sistémicas y su distribución en el medio ambiente principalmente en peces.

## Material y Métodos

Se obtuvo pescado para consumo humano extraído del Río Nazas, se pesaron 25 g del pescado de diferentes partes del pez (incluye vísceras) para inocular 225 ml de caldo *Aeromonas*. Se homogenizó y se tomaron 25 µL en una placa de agar Mac Conkey y agar sangre con 20 mg/L de ampicilina.

Se incubó durante toda la noche. Se resembró el pre-enriquecimiento en los agares ya mencionados. La identificación de las colonias se realizó con pruebas primarias y por pruebas miniaturizadas en placas NC-44 por el método automatizado de Micros Can4.

## Método de trabajo

Se identificaron las colonias oxidasa positiva y se sometieron a la identificación inoculando paneles NC44 para Gram negativos por el sistema de pruebas miniaturizadas Micros Can4. Se obtuvieron diferentes microorganismos como *Enterobacterias* 68%, (*Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*), *Pseudomonas* 9.2%, *Salmonella enterica* 1.5%, *Plesiomonas* 2.3% y *Aeromonas* 19%, algunos de ellos de importancia clínica.

Solo se identificó la especie *hydrophila* debido a la gran diversidad genética, en la actualidad existen más de 32 especies y los sistemas automatizados solo identifican *A. hydrophila* y *A. species*.

## Discusión

En nuestro estudio se pudo aislar el género *Aeromonas* siguiendo el método del doble paso e identificar el microorganismo por sistema automatizado Microscan en un panel NC44,

sin embargo solo se aisló la especie *hydrophila* debido a que el sistema automatizado solo identifica esta especie, tal como los describe Figueras debido a que en la actualidad hay 32 especies de amplia distribución en el medio ambiente. En México solo se conoce la asociación del género *Aeromonas* con cuadros diarreicos, cada vez hay evidencias en enfermedades sistémicas, lo cual coincide con las investigaciones de Castelo-Branco y además afirma el impacto de los factores de virulencia y resistencia. En los estudios realizados por el Instituto de Salud Pública de México hacen hincapié en la búsqueda de *Aeromonas* en peces y aunque aislaron un 23% en peces, nosotros aislamos 19% el cual es significativo ya que no hay datos de cuál es la prevalencia en México.

## Conclusiones

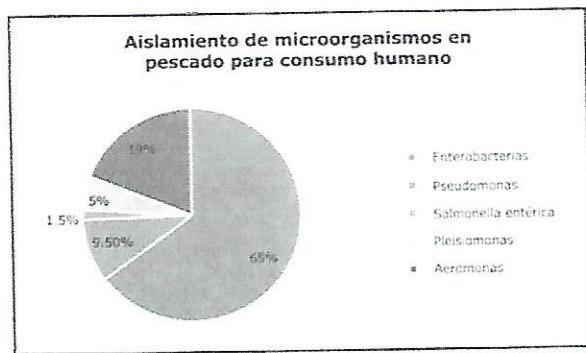
En nuestro estudio se logró aislar el género *Aeromonas* y la especie *hydrophila* en un 19%. En la actualidad existen más de 32 especies y que debido a la diversidad genética están presentes como agentes etiológicos de enfermedad tanto en seres humanos, como en pescados, lo cual constituye un factor de riesgo para la salud, pero se aislaron también otros microorganismos que pueden causar enfermedades sistémicas en pacientes inmunosuprimidos.

La búsqueda dirigida de este género favorece que podamos realizar estudios que permitan el aislamiento de más especies por el método de PCR multiplex con mayor precisión. Hasta el momento los sistemas automatizados solo cuentan la especie *hydrophila*, debido a la gran diversidad genética.

## Referencias

1. Bartkova, S., B. Kokotovic, et al. (2017). "Detection and quantification of *Aeromonas salmonicida* in fish tissue by real-time PCR." *J Fish Dis* 40(2): 231-242.
2. Castelo-Branco, D. S., A. L. Silva, et al. (2017). "Aeromonas and Plesiomonas species from scarlet ibis (*Eudocimus ruber*) and their environment: monitoring antimicrobial susceptibility and virulence." *Antonie Van Leeuwenhoek* 110(1): 33-43.
3. Cui, L., H. Hu, et al. (2016). "Identification and Characterization of MicroRNAs in the Liver of Blunt Snout Bream (*Megalobrama amblycephala*) Infected by *Aeromonas hydrophila*." *Int J Mol Sci* 17(12).
4. Chenia, H. Y and S. Duma (2017). "Characterization of virulence, cell surface characteristics and biofilm-forming ability of *Aeromonas spp.* isolates from fish and sea water." *J Fish Dis* 40(3): 339-350.
5. Figueras, M. J., F. Latif-Eugenin, et al. (2017). "*Aeromonas intestinalis* and *Aeromonas enter-*

- ca*' isolated from human faeces, '*Aeromonas crassostreae*' from oyster and '*Aeromonas aquatilis*' isolated from lake water represent novel species." *New Microbes New Infect* 15: 74-76.
6. Kralova, S., E. Stankova, et al. (2016). "Classification of *Aeromonas* spp. isolated from water and clinical sources and distribution of virulence genes." *Folia Microbiol (Praha)* 61(6): 513-521.
7. Pang, M., X. Xie, et al. (2017). "Identification of novel virulence-related genes in *Aeromonas hydrophila* by screening transposon mutants in a *Tetrahymena* infection model." *Vet Microbiol* 199: 36-46.
8. William Suárez Q.1, Fanny Herrera A. (2011). ISOLATION OF *Aeromonas* spp. IN FRESH FISH SAMPLES MARKETED IN PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER). *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 14 (2): 7 - 13. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 14 (2): 7 - 13.



**Para correspondencia:**  
 José de Jesús Alba-Romero

Facultad de Ciencias Químicas UJED, Calle Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. C.P. 35010. Tel (871) 715 88 10 y 715 29 64.  
 Correo electrónico: Jalbar\_1@hotmail.com

## Breves de Ciencia

Detectan bacterias "pesadilla" resistentes a antibióticos en 27 estados de EE.UU.

Más de 200 genes inusuales resistentes a los antibióticos se hallaron en bacterias "pesadilla" en 2017.

Según un informe de Vital Signs publicado este martes por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos.

El informe se centró en los gérmenes nuevos y altamente resistentes que aún no se han expandido ampliamente. No obstante, ya se puede encontrar una diversidad de gérmenes resistentes en todos los estados de Estados Unidos.

Analizando 5.776 gérmenes resistentes a antibióticos de hospitales y hogares de ancianos, los CDC descubrieron que aproximadamente uno de cada cuatro tenía un gen que ayudaba a propagar su resistencia, mientras que 221 contenía un "gen de resistencia particularmente extraño" mencionó la doctora Anne Schuchat, subdirectora principal de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades CDC.

**¿Qué es una bacteria "pesadilla"?**

En 1988, los funcionarios de salud de Estados Unidos descubrieron que algunos gérmenes dentro de una familia de bacterias, Enterobacteriaceae, podían producir una enzima capaz de descomponer los antibióticos comunes.

En 2001, los gérmenes habían comenzado a evolucionar, volviéndose más resistentes a los carbapenémicos y otros antibióticos. Estas Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos, o CRE, llamadas "bacterias pesadilla" por los CDC, se propagaron rápidamente en EE.UU. y en todo el mundo.

Fuente: CNN en español  
 Miércoles 04 de Abril, 2018



# *CHRNA3 rs1051730 and CHRNA5 rs16969968 polymorphisms are associated with heavy smoking, lung cancer, and chronic obstructive pulmonary disease in a mexican population*

Rebeca Pérez-Morales<sup>1</sup> | Alberto González-Zamora<sup>2</sup> | María Fernanda González-Delgado<sup>1</sup> | Esperanza Y. Calleros Rincón<sup>1</sup> | Edgar H. Olivas Calderón<sup>1</sup> | Ollin Celeste Martínez-Ramírez<sup>3</sup> | Julieta Rubio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Durango, México

<sup>3</sup>Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México

<sup>4</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

## Correspondence

Rebeca Pérez-Morales, Laboratorio de Biología Celular Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, C.P. 35010, Gómez Palacio, Durango, México.  
Email: rebecapms@ujed.mx

## Abstract

**Background and purpose:** Smoking is a major public health problem worldwide. Polymorphisms in *CHRNA3*, *CHRNA5*, and *CHRN4* receptors play a critical role in nicotine dependence, lung cancer (LC) risk, and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). This study characterized the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms in a Mexican population and its association with nicotine dependence, LC, and COPD.

**Methods:** The study included 312 healthy individuals, 74 LC cases and 117 COPD cases. Genotyping was performed using TaqMan probes, and the data were analyzed using logistic regression adjusted for covariates.

**Results:** The polymorphism *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 were in the Hardy–Weinberg equilibrium and the allelic frequency of the A allele was 0.15, for both polymorphisms. The smokers were stratified in heavy smokers and moderate/light smokers, and we found in A alleles an OR = 2.86 ( $P = 0.01$ ) to *CHRNA3* rs1051730 and OR = 3.12 ( $P = 0.03$ ) to *CHRNA5* rs16969968. In addition, the A alleles in *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 were associated with the risk for LC (OR = 1.66,  $P = 0.07$  and OR = 1.57,  $P = 0.1$ , respectively) and for COPD (OR = 2.04,  $P = 0.01$  and OR = 1.91,  $P = 0.02$ , respectively).

**Conclusion:** *CHRNA3/5* polymorphisms are associated with nicotine dependence, LC, and COPD in Mexicans.

## KEY WORDS

*CHRNA3*, *CHRNA5*, chronic obstructive pulmonary disease, lung cancer, Mexican population, nicotine dependence

## 1 | INTRODUCTION

Smoking is a major public health problem because tobacco consumption is directly related to chronic obstructive pulmonary disease (COPD), such as emphysema or bronchitis,

and primary LC; these diseases are attributed to smoking in 80–90% of cases (Rabe & Watz, 2017). In addition, tobacco use is associated with morbidity and mortality from other diseases, such as cardiovascular disease, asthma, and other neoplasia (Georgiadis et al., 2016). Prospective studies indicate

that in 2030, tobacco use will be responsible for 10 million deaths, making it the leading cause of preventable death (Jha, Phil, & Peto, 2014).

In Mexico, the National Survey of Addictions (NSA) reported that smoking is a major addiction in our country. Approximately 17.3 million, or 21.7%, of Mexicans between 12 and 65 years of age have tried a cigarette at some point in their life and are considered active smokers. In addition, 8.9% were reported to smoke daily, and 12.8% to smoke occasionally (NSA, 2011).

The consumption of tobacco has been stratified into three levels: light daily smokers are defined as everyday smokers who consume 1–5 cigarettes per day (cpd), moderate daily smokers as everyday smokers who consume 6–19 cpd, and heavy daily smokers as everyday smokers who consume 20 or more cpd (Sakuma et al., 2015). According to the NSA (NSA, 2011), among daily smokers, the average was of 6.8 cpd in men and 5.6 cpd in women, suggesting that most active smokers are in the range of light to moderate smoking. In addition, tobacco consumption differed between men (31.4%) and women (12.1%). The age of smoking initiation is usually between 10 and 24 years old and occurred mainly due to imitation, curiosity, or social pressure. Currently, the need to implement comprehensive tobacco control strategies to reduce dependence and related diseases has been highlighted (Pierce, White, & Emery, 2012).

In this context, the Fagerström Test for Nicotine Dependence (FTND) is a standard instrument for assessing the intensity of physical addiction to nicotine, this test provides an ordinal measure of nicotine dependence related to cigarette smoking. Nicotine is the main addictive component in tobacco; however, during combustion, thousands of toxic and carcinogenic substances are produced (Willis et al., 2014). Nicotine has effects on the central nervous system and metabolism, which are regulated by several biological pathways; genetic studies have revealed a high degree of heritability of smoking and nicotine dependence (Ross et al., 2016). In recent years, large genome-wide association studies (GWAS) and meta-analyses have revealed that the strongest genetic contribution to smoking-related traits comes from variations in the nAChR subunit genes (Loukola, Hällfors, Korhonen, & Kaprio, 2014).

Thorgeirsson et al. (2008) and Hung et al. (2008) characterized a genomic region (15q) that has been associated with LC. The 15q25 locus, which corresponds to the *CHRNA3*, *CHRNA5*, and *CHRNAB4* genes, encodes the nicotinic receptors that are expressed in neurons, alveolar epithelial cells, and pulmonary neuroendocrine cells as well as in some LC cell lines and that play an important role in nicotine dependence (Imaprogo, Soll, Tapper, & Gardner, 2013). Although several animal models (Fowler, Tuesta, & Kenny, 2013) and epidemiological (Sun et al., 2016) studies have been conducted, the molecular mechanism has not yet been clarified.

The *CHRNA* receptors are stimulated by nicotine, and polymorphisms in these genes could modulate its effects. Several SNPs have been studied, and *CHRNA3* rs1051730, which corresponds to a synonymous change (Y215Y), is highly correlated ( $r^2 = 0.79$ ,  $P < 0.0001$ ) with *CHRNA5* rs16969968, a non-synonymous change (D398N), and both give a high response to nicotinic agonists in *in vitro* studies (Saccone et al., 2009). In another study, these polymorphisms were very common in heavy smokers who also had higher levels of nitrosamines and other derivatives from the combustion of tobacco compared to smokers who did not have the polymorphisms. The authors concluded that it is possible that carriers of the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms are more susceptible to diseases related to tobacco consumption through nicotine dependence and exposure to an oxidizing microenvironment (cytotoxic and genotoxic), which produce the molecular mechanisms that characterize the disease. In the case of COPD, these mechanisms include the inflammatory response, and in LC, mutations that increase cellular proliferation (Le Marchand et al., 2008).

Genetic biomarkers are useful for analyzing genetic predisposition to certain diseases caused by the exposure to toxic compounds. The determination of *CHRNA* polymorphisms could help to identify populations susceptible to cigarette smoke and therefore to prevent associated diseases. In this study, our aim was to determine the frequency of the polymorphisms *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 in a sample of the Mexican Mestizo population and correlate it with the level of smoking in healthy smokers as well as determine the association of these polymorphisms with LC and COPD.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Ethics approval and consent to participate

The research protocol was approved by the bioethics committees of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas," INER, Mexico City, and the Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango. The study was performed under an ethical agreement and maintained individual anonymity; informed consent was obtained from each participant.

### 2.2 | Subjects

A cross-sectional, descriptive and comparative study was carried out and also case-control design was used. The study recruited blood samples of unrelated volunteers who were Mexican Mestizo individuals with Mexican-born parents and

grandparents. The subjects for the descriptive study were 312 individuals who were healthy, including 192 smokers and 120 never smokers. In the case-control study the 192 healthy smokers of the descriptive study were included as controls and the cases were 74 individuals diagnosed with LC and 117 diagnosed with COPD; all cases were smokers. The participants answered a questionnaire of self-declaration containing questions about age, gender, exposure factors such as number of cigarettes smoked per day, years of smoking, and other data of epidemiological importance. Nicotine dependence was assessed at enrolment using the FTND among healthy smokers, and the pack-year index was calculated by cigarettes per day multiplied per smoking years/20. This calculator helps to produce a numerical value of lifetime tobacco exposure called pack-years. A pack-year is defined as 20 cigarettes smoked every day for 1 year.

The LC and COPD patients were recruited in the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas," INER, Mexico City. LC patients were evaluated histologically with lung biopsy or resection specimens according to the American College of Chest Physicians guidelines by a professional pathologist. COPD was considered as any patient who had dyspnea, chronic cough, or sputum production. The spirometry studies were performed by professional pneumologists according to the guidelines of the American Thoracic Society.

### 2.3 | Genotyping

Genomic DNA was purified from blood samples by the salting out method and ethanol precipitation. *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphism status was determined using TaqMan probe C\_9510307\_20 and C\_26000428\_20, respectively (Applied Biosystems, Foster City, California). Genotyping was determined using a Step One Real-Time PCR System from Applied Biosystems following the manufacturer's conditions.

### 2.4 | Statistical analyses

The analysis of the variables was conducted by Student's *t*-test for quantitative continuous variables and by the  $\chi^2$ -test for nominal variables in SPSS 19.0. The genotypic and allelic frequency, correlation, and association analyses were performed using the STATA 13 statistical software package. The co-dominant and additive models were adjusted for confounding variables such as age and sex. Statistical significance was considered if  $P \leq 0.05$ . Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium were analyzed with GENEPOL software, which is available at <https://genepop.curtin.edu.au/> and was consulted on October 15, 2017.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Genotypic and allelic frequencies of the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 in smokers and never smokers

To determinate the allelic frequencies of the polymorphisms in the control population, 312 healthy individuals were analyzed: 192 were smokers and 120 were never smokers. The characteristics of the sample are shown in Table 1. No significant differences were found for age, but for gender, there was a higher proportion of male smokers (67%) and never smoker women (57%) ( $P = 0.01$ ). Among smokers, 58% were light smokers, 27% moderate smokers, and 15% heavy smokers (Table 1).

The polymorphisms *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 were genotyped in all individuals; smokers and never smokers. For *CHRNA3* rs1051730, the frequency of the homozygous wild-type genotype G/G was 0.73, the heterozygous G/A was 0.25 and the homozygous polymorphic A/A was 0.02, while for *CHRNA5* rs16969968, the frequencies were 0.72 (G/G), 0.26 (G/A), and 0.02 (A/A) (Table 2). For both polymorphisms, the frequency was 0.85 for the G allele and 0.15 for the polymorphic A allele, and both were in Hardy-Weinberg equilibrium.

The comparison of the genotype frequencies showed no significant difference in the distribution in smokers and never smokers for *CHRNA3* rs1051730 ( $P = 0.71$ ) or *CHRNA5* rs16969968 ( $P = 0.75$ ). Linkage disequilibrium between rs1051730 and rs16969968 was analyzed obtaining an LOD > 2, D' = 1 and  $r^2 = 0.98$  (LOD is the log of the odds of there being Linkage Disequilibrium between two loci). The 71% corresponded to the GG/GG genotypes, 25% to the GA/GA genotypes, 2% to the AA/AA genotypes, and 2% to another combination of genotypes for *CHRNA3* rs1051730/*CHRNA5* rs16969968.

### 3.2 | Association of *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 with nicotine dependence among smokers

To determine the influence of the polymorphisms on nicotine dependence, we analyzed the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 genotypic frequencies while stratifying the smoker population. Analyzing the general characteristics of these groups revealed significant differences in age, sex, and smoking status; men smoked more than women, and the heavy smokers were mainly older people who had the highest pack-year index with values up to 92 and FTND > 4 (Table 3).

We used the quantitative measure of smoked cigarettes per day with the cut-off point reported by Sakuma et al. (2015) for nicotine dependence and the light to moderate smokers were compared to the heavy smokers. The genotype G/A of

**TABLE 1** General characteristics and smoking status of the healthy Mexican Mestizo population sample

	<b>Smokers (<i>n</i> = 192)</b>	<b>Never smokers (<i>n</i> = 120)</b>	<b>P-value</b>
<b>Age</b>			
Median (min-max)	43 (16–97)	48 (16–84)	0.18 <sup>a</sup>
<b>Gender <i>n</i> (%)</b>			
Men	129 (67)	52 (43)	0.01 <sup>b</sup>
Women	63 (33)	68 (57)	
<b>Pack-year index</b>			
Median (min-max)	3.8 (0.05–103)	N/A	
<b>Smoking status <i>n</i> (%)</b>			
Light (1–5 cpd)	110 (58)	N/A	
Moderate (6–19 cpd)	52 (27)	N/A	
Heavy (>20 cpd)	30 (15)	N/A	

Legend: N/A: No applied; cpd: cigarettes per day.

<sup>a</sup>Mann-Whitney Test.<sup>b</sup> $\chi^2$ -test.**TABLE 2** Genotypic and allelic frequencies of *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphism in healthy Mexican Mestizo population

<b>Polymorphism</b>	<b>All individuals <i>n</i> = 312</b>	<b>Smokers <i>n</i> = 192</b>	<b>Never smokers <i>n</i> = 120</b>	<b><math>\chi^2</math> (P-value)</b>
<i>CHRNA3</i> rs1051730	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
G/G	227 (73)	138 (72)	89 (74)	
G/A	79 (25)	51 (26)	28 (23)	
A/A	6 (2)	3 (2)	3 (3)	0.69 (0.71)
G <sup>a</sup>	0.85	0.85	0.85	
A <sup>b</sup>	0.15	0.15	0.15	
<i>CHRNA5</i> rs16969968	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
G/G	225 (72)	136 (71)	89 (74)	
G/A	80 (26)	52 (27)	28 (23)	
A/A	7 (2)	4 (2)	3 (3)	0.57 (0.75)
G <sup>a</sup>	0.85	0.84	0.86	
A <sup>b</sup>	0.15	0.16	0.14	

<sup>a</sup>Wild-type allele frequency.<sup>b</sup>Polymorphic allele frequency. $\chi^2$ -test compare smokers vs never smokers.**TABLE 3** Stratification of the healthy smoker population and its general characteristics

	<b>Light <i>n</i> = 110</b>	<b>Moderate <i>n</i> = 52</b>	<b>Heavy <i>n</i> = 30</b>	<b>P-value</b>
<b>Age</b>				
Median (Min–Max)	30 (16–97)	49 (17–81)	57 (22–75)	0.01 <sup>a</sup>
<b>Gender <i>n</i> (%)</b>				
Men	64 (58)	42 (81)	23 (77)	0.01 <sup>b</sup>
Women	46 (42)	10 (19)	7 (23)	
<b>Pack-year index</b>				
Median (Min–Max)	1.45 (0.05–30)	14.1 (0.3–50)	34.5 (10–92)	0.001 <sup>a</sup>
<b>Cigarettes per day</b>				
Median (Min–Max)	3 (1–5)	10 (6–19)	20 (20–40)	0.0001 <sup>a</sup>
<b>Fagerström Test of Nicotine Dependence</b>				
Median (Min–Max)	0 (0–2)	2 (0–6)	7 (4–10)	0.0001 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Kruskal-Wallis test.<sup>b</sup> $\chi^2$ -test.

**TABLE 4** Association of *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms and the nicotine dependence among healthy smokers

<i>CHRNA3</i> rs1051730	Light/moderate smokers n (%)	Heavy smokers n (%)	OR (CI 95%)	P-value
G/G	120 (74)	17 (57)	1	
G/A	40 (25)	12 (40)	<b>3.38 (1.28–8.93)</b>	<b>0.01<sup>a</sup></b>
A/A	2 (1)	1 (3)	4.35 (0.32–58.24)	0.26
q (A)	0.14	0.23	<b>2.86 (1.24–6.58)</b>	<b>0.01<sup>a</sup></b>
<i>CHRNA5</i> rs16969968				
G/G	120 (74)	16 (53)	1	
G/A	39 (24)	13 (44)	<b>3.89 (1.48–10.22)</b>	<b>0.006<sup>b</sup></b>
A/A	3 (2)	1 (3)	4.35 (0.33–55.89)	0.25
q (A)	0.14	0.25	<b>3.12 (1.09–10.03)</b>	<b>0.03<sup>b</sup></b>

<sup>a</sup>Logistic regression under codominant model adjusted by age and sex.

<sup>b</sup>Logistic regression under additive model adjusted by age and sex.

Highlighted in bold significant values.

*CHRNA3* rs1051730 had an OR = 3.38 ( $P = 0.01$ ), and the genotype G/A of *CHRNA5* rs16969968 had an OR = 3.89 ( $P = 0.006$ ) (Table 4), suggesting that these genotypes promote dependence on nicotine, since the heavy smokers had a higher frequency of the A allele in rs1051730 and rs16969968; also this group had high values of pack-year index and FTND. A nonsignificant OR > 4 was found for the A/A genotype of both polymorphisms, although this result was probably due to the small number of individuals in this genotype category. Because of the low frequency of A/A homozygotes, the association analysis was performed using the additive model, which shows the influence of a single allele. An OR = 2.86 ( $P = 0.01$ ) was found for the *CHRNA3* rs1051730 allele A and an OR = 3.12 ( $P = 0.03$ ) for the *CHRNA5* rs16969968 allele A. The direction of effect was consistent between the codominant and additive models, and in both cases, the statistical significance was maintained.

### 3.3 | Association of *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 with susceptibility to lung cancer and COPD

To analyze the susceptibility to LC and COPD, the population of healthy smokers was used as controls. Table 5 shows the general characteristics of the study population. The patients with COPD were older (median = 68) and had a higher pack-year index (median = 30), with a higher proportion of a moderate-to-heavy smoking level compared to the cases with LC. Among the LC cases, we found different histological types, such as small cell carcinoma, squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and mesothelioma, but only cases with a smoking history were included.

When the association of *CHRNA3* rs1051730 genotypes with susceptibility to LC was analyzed using the codominant model, an OR = 1.79 ( $P = 0.08$ ) and 2.15 ( $P = 0.4$ ) was found for the G/A genotype and the A/A genotype, respectively, while in the additive model, an OR = 1.66 ( $P = 0.07$ ) was

obtained. With respect to the association of the genotypes of *CHRNA5* rs16969968 with LC, using the codominant model, an OR = 1.71 ( $P = 0.1$ ) and 1.79 ( $P = 0.5$ ) was found for the G/A genotype and the A/A genotype, respectively, while in the additive model, an OR = 1.57 ( $P = 0.1$ ) was obtained (Table 6).

Regarding the association of the *CHRNA3* rs1051730 genotypes with susceptibility to COPD, using the codominant model, an OR = 2.13 ( $P = 0.03$ ) was found for the G/A genotype, while an OR = 5.35 ( $P = 0.04$ ) was found for the A/A genotype. In contrast, using the additive model, an OR = 2.04 ( $P = 0.01$ ) was obtained. With respect to the association of the genotypes of *CHRNA5* rs16969968 with COPD, using the codominant model, an OR = 1.93 ( $P = 0.05$ ) was found for the G/A genotype, and an OR = 5.08 ( $P = 0.04$ ) was found for the A/A genotype. In contrast, using the additive model, an OR = 1.91 ( $P = 0.02$ ) was obtained (Table 6). Using both models of inheritance, the direction of effect of the OR was maintained.

## 4 | DISCUSSION

Smoking is responsible for at least 5 million deaths annually worldwide and is linked to the mortality of diseases such as COPD, various types of cancer, particularly LC, and cardiovascular diseases. Although these diseases are closely related to regular tobacco use, only 20% of smokers develop these diseases, suggesting that in addition to environmental factors, there is genetic predisposition. In this study, the age of most smokers was found to be approximately 40 years, with a higher percentage of men who smoked and a greater pack-year index in men than in women, as previously reported in other studies (Coste, Quinquis, Almeida, & Audureau, 2014).

The frequencies of the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms in Mexican Mestizo populations are different from other populations, particularly of

**TABLE 5** Characteristics of the healthy smoker controls, lung cancer, and COPD patients

Parameter	Control population n = 192	Lung cancer patients n = 74	COPD patients n = 117	P-value
Age				
Median (Min–Max)	43 (16–97)	61 (23–84)	68 (37–88)	<b>0.01<sup>a</sup></b>
Sex n (%)				
Women	63 (33)	15 (20)	44 (38)	<b>0.02<sup>b</sup></b>
Men	129 (67)	59 (80)	73 (62)	
Pack-year index	3.8 (0.05–103)	25 (2–70)	30 (0.6–135)	<b>0.001<sup>a</sup></b>
Smoker classification n (%)				
Light	110 (57)	21 (28)	18 (15)	<b>0.001<sup>b</sup></b>
Moderate	52 (27)	17 (23)	40 (34)	
Heavy	30 (16)	36 (49)	59 (51)	
Histological type				
Small cells	NA	17 (23)	NA	NA
Squamous carcinoma	NA	22 (30)	NA	NA
Adenocarcinoma	NA	25 (34)	NA	NA
Mesothelioma	NA	10 (13)	NA	NA

<sup>a</sup>Kruskai-Wallis test.<sup>b</sup> $\chi^2$ -test.

Highlighted in bold significant values.

Legend: NA: not applied.

Asian, Asian, and African populations, which have been reported several studies. In our study, we found a frequency of 15% for the A allele in both polymorphisms. For instance, very low frequencies have been reported in the case of Asians (1–3%), intermediate frequencies in Africans (4–9%), and high frequencies in Caucasians (34–65%) (Table 7). It has been proposed that the presence of polymorphisms in the *CHRNA5/CHRNA3/CHRN B4* cluster is related to the efficacy of antismoking programs. Hayes and Borrelli (2013) conducted a study of smoking habits, risk perception, and smoking cessation in the Hispanic population (Puerto Rico, Dominican Republic, Central America, Mexico, and South America) and found that most of the subjects were classified as light smokers who quit smoking easily. Halldén et al. (2016) performed a prospective study of a cohort of 18,326 women born between 1923 and 1950 and 12,121 men born between 1923 and 1945, and they found that the first incident events were COPD, cancers related to smoking, and/or cardiovascular disease. They also analyzed the polymorphisms in *CHRNA3* and *CHRNA5* and found that the A allele was associated with an increase in the incidence of COPD, smoking-related cancers and mortality, even after adjusting for the number of cigarettes smoked per day; this effect was not found in never smokers.

Because of the above, several countries have focused on generating smoking ban policies and national health programs to reduce tobacco consumption. A study performed by Sakuma et al. (2015) in population of African-descent

and non-Hispanic Caucasians found that African-descent population had a higher success rate in smoking cessation treatment. On the other hand, Sakuma et al. (2016) conducted a study in which participants were stratified into non-Hispanic Caucasians, Hispanics, Asians, and African-descent populations, and they found that there is a better response to smoking cessation in African-descent and Asian populations and that the individuals in these two ethnic groups were mainly light smokers. The authors concluded that there are genetic bases, including nicotinic receptors, that influence nicotine dependence and smoking cessation treatment. Currently, efforts are being directed at specific populations to implement control programs for tobacco consumption.

In our study, the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium in the healthy population, and linkage disequilibrium was found in 98% of the cases. It has been reported that there is a perfect correlation of SNPs of the *CHRNA5/CHRNA3/CHRN B4* cluster in Europeans and a correlation of 79% in Afro-American and American-Caucasian populations so that the use of a single marker is indicative of attributed risk. In our study, a high correlation was found, because only 2% exhibited other combinations of SNPs. This finding opens the possibility of carrying out population genetic susceptibility studies by analyzing a single locus because the result for one SNP is predictive of the other; this possibility would be of great relevance for smoking cessation

**TABLE 6** Association of *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 with lung cancer and COPD in Mexican Mestizo population

Polymorphism	Control population	Lung cancer patients n = 74	OR (CI 95%)	P-value	COPD patients n = 117	OR (CI 95%)	P-value
	n = 192 n (%)	n (%)			n (%)		
<i>CHRNA3</i> rs1051730							
Codominant							
GG	138 (72)	45 (61)	1		69 (59)	1	
GA	51 (26)	26 (35)	1.79 (0.92–3.47) <sup>a</sup>	0.08	42 (36)	<b>2.13 (1.07–4.25)<sup>a</sup></b>	<b>0.03</b>
AA	3 (2)	3 (4)	2.15 (0.36–12.85) <sup>a</sup>	0.4	6 (5)	<b>5.35 (1.04–27.38)<sup>a</sup></b>	<b>0.04</b>
Additive							
A			1.61 (0.98–2.66)	0.05		<b>1.75 (1.14–2.68)</b>	<b>0.01</b>
A <sup>a</sup>			1.66 (0.95–2.91) <sup>a</sup>	0.07		<b>2.04 (1.15–3.61)<sup>a</sup></b>	<b>0.01</b>
<i>CHRNA5</i> rs16969968							
Codominant					n (%)		
GG	136 (71)	45 (60)	1		69 (59)	1	
GA	52 (27)	27 (36)	1.71 (0.89–3.28) <sup>a</sup>	0.1	42 (36)	1.93 (0.97–3.83) <sup>a</sup>	0.05
AA	4 (2)	2 (4)	1.79 (0.2–11.35) <sup>a</sup>	0.5	6 (5)	<b>5.08 (1.01–25.58)<sup>a</sup></b>	<b>0.04</b>
Additive							
A			1.46 (0.88–2.40)	0.13		<b>1.63 (1.07–2.48)</b>	<b>0.02</b>
A <sup>a</sup>			1.57 (0.90–2.75) <sup>a</sup>	0.1		<b>1.91 (1.08–3.36)<sup>a</sup></b>	<b>0.02</b>

<sup>a</sup>Logistic regression under codominant or additive model adjusted by age, sex, and pack-year index.

Highlighted in bold significant values.

**TABLE 7** Association studies of risk A alleles in both *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 in different populations

Polymorphism	OR	P-value	Disease	Population	Reference
<i>CHRNA3</i> rs1051730	2.4	0.00008	Lung cancer	Japanese	Shiraishi et al., 2009
	1.39	0.0001	Emphysema	Caucasian	Lambrechts et al., 2010
	1.26	0.0001	COPD	Meta-analysis	Zhang, Summeh, Zhu, & Ming, 2011
	1.93	0.0001	Emphysema	Meta-analysis	Zhang et al., 2011
	1.7	0.0001	COPD	Caucasian	Kaur-Knudsen et al., 2012
	1.8	0.002	Lung cancer	Caucasian	Kaur Knudsen et al., 2012
	1.4	0.17	COPD	Chinese	Zhou et al., 2012
	2.15	0.02	Lung cancer	Mestizo Mexican	This study
<i>CHRNA5</i> rs16969968	2.04	0.03	COPD	Mestizo Mexican	This study
	2.2	0.0001	Lung cancer	Japanese	Shiraishi et al., 2009
	1.4	0.01	COPD	Chinese	Zhou et al., 2012
	1.29	0.0001	Lung cancer	Caucasian	Xu et al., 2015
	1.02	0.86	Lung cancer	Asian	Xu et al., 2015
	2.04	0.03	Lung cancer	Mestizo Mexican	This study
	1.89	0.06	COPD	Mestizo Mexican	This study

treatments, as it would allow genetic analysis to be performed with less cost.

Logistic regression analyses showed that there is an association between the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms and nicotine dependence in smokers (Table 4); the risk is increased if the individual carries the polymorphic A allele in any locus. Spitz, Amos, Dong, Lin, and Wu (2008) reported an association between *CHRNA3* rs1051730 and nicotine dependence in a Caucasian popula-

tion where the A allele had an OR = 2.14 ( $P = 0.006$ ), and Olfson et al. (2015) reported a frequency of 0.35 for the A allele and an association with nicotine dependence in European Caucasians ( $OR = 1.27, P = 0.03$ ). In addition, in African Americans, the frequency of the A allele was 0.058 and an OR = 1.46,  $P = 0.04$  was found.

Several authors have reported the importance of these polymorphisms in the dependence and intensity of smoking and its relation with associated diseases, both in *in vitro* (Oni et al..

2016) and in epidemiological studies, which have been replicated in several populations (Zhang et al., 2011; Zhou et al., 2012; Zhao et al., 2015).

In addition, Lutz and Hokanson (2014) emphasized the importance of tobacco-related behavior and the biological pathways involved in tobacco metabolism. They integrated these factors in a mediation analysis that leads to clinical manifestations and proposed an algorithm that analyzes genetic susceptibility data, smoking status, and exposure markers that can allow the monitoring of vulnerable populations for the purpose of early diagnosis. However, to perform this type of intervention, it is necessary to have the genetic data of specific populations and to determine that the association between the susceptibility variants and the incidence of COPD and/or cancer are replicated in that population.

In this regard, the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms were associated with the risk of LC and COPD in the Mexican Mestizo population. In the case of LC, we found a significant association of *CHRNA3* rs1051730 using the codominant and additive models, even after adjusting for age and sex. We also found a significant association of *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 alone using the additive model (Table 6). In COPD, the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms showed a significant association in the codominant and additive model, indicating that the associations were consistent with previous studies in other populations (Table 7), demonstrating the association of LC and COPD in different populations. In addition, meta-analysis studies have confirmed the associations, mainly in the Caucasian population (Xu et al., 2015).

The above data show that there is a strong correlation between the presence of the *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms and the nicotine dependence (Bierut et al., 2008; Borrego-Soto et al., 2015) and the risk of LC or COPD in several populations (Doyle et al., 2011; Kaur-Knudsen, Nordestgaard, & Bojesen, 2012; Lambrechts et al., 2010; Shiraishi et al., 2009). These findings were replicated in the Mexican population; however, the risk is not direct; this genotype becomes important when an environmental factor, such as a smoking habit, is present. It is necessary to carry out genetic studies in smoking clinics and integrate these data into treatment management as well as to create more efficient antismoking programs that are capable of raising the awareness of the population to reduce long-term risks. Such programs should pay special attention to the onset of smoking because most smokers begin to smoke due to curiosity and imitation. Then, the habit is later reinforced according to their genetic and social context.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the INER for the blood samples and the clinic diagnostics of the patients and QFB. Sarai Mon-

sivais Zacarias for the recollection of blood samples, Juan José Velázquez Diosdado, and Verenice Hernández Sifuentes for the technical assistance in the DNA extraction and genotyping.

## DECLARATION OF PERSONAL INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

## DECLARATION OF FUNDING INTERESTS

This study was supported by grant Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN210111 and IN208314 (JR) from the Universidad Nacional Autónoma de México and Programa de Fortalecimiento a la Infraestructura (PIFI-SEP) 2013–2015 to Facultad de Ciencias Químicas from Universidad Juárez del Estado de Durango (RPM).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RPM and AGZ: conceived and design the study and draft the manuscript; MFGD: recruited healthy participants, realized the genotyping of patients, data integration and analyses; AGZ, helped in statistical analyses and its interpretation; EYCR, EHOC, OCMR, and JR: helped in the discussion and draft the manuscript.

## ORCID

Rebeca Pérez-Morales 

<http://orcid.org/0000-0003-1102-4553>

## REFERENCES

- Bierut, L., Stitzel, J. A., Wang, J. C., Hinrichs, A. L., Grucza, R. A., & Xuei, X. (2008). Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence. *American Journal of Psychiatry*, 165(9)1163–1171. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07111711>.
- Borrego-Soto, G., Costilla-Esquível, A., Padilla-Rivas, R., Cázares-Samaniego, P., Posadas-Valay, R., & Velasco-Castañon, J. G. (2015). Association between genotype and allele frequencies of CYP2A6\*12 and rs16969968 in *CHRNA5* variants with smoking and body mass index in young subjects from Northeast Mexico. *Revista Medica de Chile*, 143, 1377–1385.
- Coste, J., Quinquis, L., Almeida, S., & Audureau, E. (2014). Smoking and health-related quality of life in the general population. independent relationships and large differences according to patterns and quantity of smoking and to gender. *PLoS ONE*, 9(3), e91562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091562>.



# REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

*Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, UJED*



Número 8  
Volumen 2  
Octubre 2018

### Cintillo Legal

Revista Mexicana de Industria y Salud, año 4 No. 7 (Mayo-Octubre), es una publicación semestral editada por la Universidad Juárez del Estado de Durango a través de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicada en Av. Artículo 123 S/N Colonia Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010. Tel (871) 7158810 ext. 118, [www.fcqgp.ujed.mx](http://www.fcqgp.ujed.mx), [editorremdis@gmail.com](mailto:editorremdis@gmail.com), [simposiumfcqujed@gmail.com](mailto:simposiumfcqujed@gmail.com). Editor responsable: M. C. Mónica Andrea Valdez Solana.

Reserva de derechos al uso exclusivo (en trámite), ISSN: 2594-1445, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Lic. Luis Antonio Montoya Jáquez, Departamento de Informática de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicado en Av. Artículo 123 S/N Col. Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010, fecha de última actualización 30 de mayo de 2018.

**REMDIS**

**Certificado de Reserva de Derecho de Autor (en trámite)**

**ISSN: 2594-1445**

**Edición en la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio**

**[editorremdis@gmail.com](mailto:editorremdis@gmail.com)**



## CONTENIDO

EDITORIAL .....	vi
- Los productos naturales como una alternativa en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Dra. Concepción García Luján	
BIOQUÍMICA .....	1
- Interpretación de los datos cinéticos para una reacción enzimática. Sierra Campos Erick, Valdez Solana Mónica Andrea.	
ALIMENTOS .....	7
- Propiedades fitoquímicas de trozos de melón confitados. Gutiérrez Alonso Perla Marisela, Reza-Vargas María del Carmen, Meza Velázquez Jorge Armando, Aguilera-Ortiz Miguel	
- Caracterización fisicoquímica, betalaínas y capacidad antioxidante en pitaya ( <i>Stenocereus griseus</i> H.) y tuna roja ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) Montelongo Campista Carmen Edith, Reza-Vargas María del Carmen, Sierra Campos Erick, Aguilera-Ortiz Miguel	
QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA .....	20
- Elaboración de pasta oral antiparasitaria para equinos que cumpla con los requerimientos de estabilidad de NOM-073-SSA1-2005 Rico del Río Adriana Erendira, Hernández González Sandra-Isabel, Martínez Romero Aurora, Alba Romero José de Jesús, Piñera Cuellar Alfredo, Lozano Morán Martín	
- Cuantificación de bifenilpoliclorados en suelo en diferentes áreas de la Comarca Lagunera Hernández González Sandra Isabel, Martínez Romero Aurora, Alba Romero José de Jesús, Cervantes Flores Maribel, Castro Hernández Sandra, Ortega Sánchez José Luis	
CIENCIAS BIOMÉDICAS .....	33
- Riesgo cardiovascular en sujetos VIH seropositivos con tratamiento antirretroviral: una revisión bibliográfica Miranda Pérez Alberto Alejandro, López Márquez Francisco Carlos, Roiz Bollain y Goytia Ana Paola, Urraza Robledo Arguine Iovonne	
- Prevalencia de <i>Treponema pallidum</i> en pacientes de la secretaría de salubridad y asistencia de Gómez Palacio, Durango Ochoa-García Perla Patricia, Esparza-González Sigfredo, Martínez-Romero Aurora, Hernández-González Sandra Isabel	
- Asociación entre el fenotipo del sistema de grupo sanguíneo AB0 y leucemias Ochoa-García Perla Patricia; Hernández-González Sandra Isabel; García-Contreras Luis Otoniel; Martínez-Romero Aurora; Jorge Núñez Pérez	
- Efecto hipoglucemiante y antidiabético del <i>Aloe barbadensis Miller</i> Rodríguez-González V. M., Minjares-Fuentes J. R, Candelas-Cadillo M. G. Martínez García J.J, Femenia A.	
- Metahemoglobina y cuerpos de Heinz, en niños que consumen agua contaminada por nitratos Calleros Rincón Esperanza Yasmin, Avalos Calleros Bertha Yasmin, Morales Rebeca Pérez, González Zamora Alberto, Alba Romero José de Jesús, Olivas Calderón Edgar Héctor.	
MICROBIOLOGÍA .....	64
- Actividad antimicrobiana de <i>Ariocarpus fissuratus</i> en cepas patógenas representativas Bejarano-Castro M. G., De la Fuente-Salcido N, Linaje Trevino M., Hernández-Terán F, Valencia-Castro C. M	
- Evaluación del efecto bactericida del extracto etanólico de <i>Moringa olífera</i> y determinación de la CMI por el método de alamar azul en microorganismos causantes de gastroenteritis. Flores Vielma Gonzalo Alonso, Ruiz Flores Pablo, Orozco Mora Virginia, Calleros Rincón Esperanza Yazmín, Hernández González Sandra Isabel, Martínez Romero Aurora, Alba Romero José de Jesús	
CARTELES .....	76
PROBLEMA BIOQUÍMICO .....	102
- Físicoquímica Erick Sierra Campos y Mónica Andrea Valdez Solana	
CRUCIGRAMA .....	103
- Análisis instrumental. Erick Sierra Campos y Mónica Andrea Valdez Solana	
RESPUESTA PROBLEMA ANTERIOR .....	104
- Virología	
RESPUESTA CRUCIGRAMA ANTERIOR .....	105
- Bioquímica.	

# EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Moringa oleifera* Y DETERMINACIÓN DE LA CMI POR EL MÉTODO DE ALAMAR AZUL EN MICROORGANISMOS CAUSANTES DE GASTROENTERITIS.

<sup>1</sup>Flores Vielma Gonzalo Alonso, <sup>4</sup>Ruiz Flores Pablo, <sup>5</sup>Orozco Mora Virginia, <sup>1</sup>Calleros Rincón Esperanza Yazmín, <sup>1</sup>Hernández González Sandra Isabel, <sup>1</sup>Martínez Romero Aurora, <sup>1,2,3</sup>Alba Romero José de Jesús

<sup>1</sup>División de Estudios de Postgrado e Investigación. Facultad de Ciencias Químicas. Unidad Gómez Palacio. Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Artículo 123 s/n, Fraccionamiento Filadelfia, Gómez Palacio, Dgo. CP 35010. Tel (871) 7 15 88 10 y 7 15 29 64.

<sup>2</sup>Laboratorio de Asesores Especializados de la Laguna, Gómez Palacio, Durango.

<sup>3</sup>Sanatorio San José de Gómez Palacio Durango SA de CV.

<sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina UA de C.

<sup>5</sup>Hospital General de Gómez Palacio, SSD

\* Email: [jalbar\\_1@hotmail.com](mailto:jalbar_1@hotmail.com)

## Resumen

El uso de plantas con fines terapéuticos es bien conocido en todo el mundo. La familia *Moringaceae* compuesta por 13 especies, de las cuales *Moringa oleifera* Lam. (*Moringa*), es la especie más utilizada por las comunidades indígenas. Estudios *in vitro* han demostrado la actividad antimicrobiana de *Moringa oleifera* de diferentes partes de la planta sobre los microorganismos patógenos. Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de morbilidad entre lactantes y niños. Los esfuerzos de los investigadores por buscar alternativas para combatir este problema que se presenta más en países en desarrollo proponen el uso de extractos de *M. oleifera*. En nuestro estudio determinamos la CMI por el micrométodo de Alamar Azul en cepas de *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella* entérica, *Shigella* spp y *Escherichia coli* probando extractos de tallos y hojas de la misma planta, la cual fue 3.125 mg / dL como la menor CMI en hojas y 12.5 como la mayor CMI, falta anexar la CMI de los tallos sin embargo se determinó que si tiene efecto bactericida con mayor efecto en hojas que el tallo.

## Abstract

The use of plants for therapeutic purposes is well known throughout the world. The *Moringaceae* family composed of 13 species, of which *Moringa oleifera* Lam. (*Moringa*) is the most classified species by indigenous communities. *In vitro* studies have demonstrated the antimicrobial activity of *Moringa*. Gastrointestinal diseases are the best causes of medical consultation and the leading causes of death in Mexico and the world. Gastrointestinal infections are one of the most important causes of morbidity and mortality in infants and children. The efforts of those who are used to find alternatives to solve this problem that occurs more in developing countries, propose the use of extracts of *M. oleifera*. In our study we determined the MIC for the blue Alamar micromethod in strains of *Vibrio cholerae* O1, enteric *Salmonella*, *Shigella* spp, *Escherichia coli*, testing stems and leaves of the same plant, which was 3.125 mg / dL as the lowest MIC in leaves and 12.5 as the largest CMI, however, has been determined to have a bacterial effect with greater effect on leaves than the stem.

Key words: *Moringa oleifera*, Blue Alamar, stomach flu.

Palabras Clave: *Moringa oleifera*, Alamar azul, gastroenteritis.

## Introducción

El uso de plantas con fines terapéuticos es bien conocido en todo el mundo y en la actualidad siguen siendo utilizadas con estos mismos propósitos por muchas comunidades. Dentro de las familias de plantas con mayor fama a nivel internacional descritas en el *Sushruta Samhita* destaca la familia *Moringaceae* compuesta por 13 especies, de las cuales *Moringa oleifera* Lam. (*Moringa*), es la especie más utilizada por las comunidades indígenas. Se trata de un árbol perenne de crecimiento rápido nativo del sur del Himalaya. Hoy en día es cultivado en varios países con climas tropicales y subtropicales. El uso de *M. oleifera* para el control de diversas infecciones provocadas por microorganismos es bien conocido, y en años recientes se han generado resultados científicos que confirman su actividad antimicrobiana. Las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Además, son una de las causas más importantes de morbimortalidad entre lactantes y niños. El espectro de enfermedades infecciosas está cambiando en conjunto, y se observan variaciones dramáticas en nuestra sociedad y medio ambiente, sin embargo, en los últimos 20 años se han logrado varios avances en el conocimiento de las infecciones gastrointestinales. Los principales microorganismos que causan disentería (*E. coli* diarreagénica, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Rotavirus*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*), pueden provocar cambios inflamatorios y destructivos en la mucosa del colon, por invasión directa o mediante la producción de citotoxinas. Sin embargo, algunos de los problemas más comunes en esta enfermedad son la farmacorresistencia, la adquisición de los mismos y el alto costo. Por lo que se han buscado otras alternativas, tales como llevar a cabo estudios *in vitro*, los cuales han demostrado la actividad antimicrobiana de *Moringa oleifera* de diferentes partes de la planta sobre microorganismos patógenos<sup>5</sup>. Otros autores también han concluido que la planta *Moringa oleifera* ofrece entre sus beneficios, el uso de sus extractos acuosos tanto de hojas como semillas, como alternativa natural para tratar enfermedades producidas por bacterias patógenas como son *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Shigella shinga* y *Pseudomonas aeruginosa*. Su acción bactericida consiste en la disruptión de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales (Suárez, Entenza y Doerries, 2003). El principal ingrediente

responsable de dicha actividad es el 4-(4'-O-acetil- $\alpha$ -L-ramnopiranosiloxi)-isotiocionato de bencilo, el cual tiene acción bactericida sobre varias especies patógenas, incluyendo aislados de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Legionella* resistentes a antibióticos. Hay evidencia del efecto bactericida de *Moringa oleifera* basado en la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, sin embargo, no hay estudios que evidencien de manera cuantitativa y de manera más objetiva la CMI. Por lo que el micrométodo de diluciones del documento M27-A2 del CLSI al que se le ha adicionado un indicador de crecimiento de óxido-reducción (Alamar Azul). Tiene la ventaja de que la lectura que proporciona es más objetiva, ya que los pocillos con crecimiento son de color rosa, mientras que, cuando no hay crecimiento en su interior, los pocillos se mantienen azules.

## Objetivo General

Evaluar el efecto bactericida del extracto etanólico de *Moringa oleifera* por el método de Alamar Azul en microorganismos causantes de gastroenteritis.

## Material y Métodos

Se obtuvieron muestras de hojas, tallos, flores y semillas de *Moringa oleifera* de una misma planta para conservar las mismas características de los productos. Las hojas y tallos se dejaron secar a temperatura ambiente por tres semanas evitando la exposición a la luz solar. Se procedió a pulverizar el tamaño del material vegetal seco en un molino para disminuir el tamaño de la misma y posteriormente tamizar a un tamaño de partícula del #30. Se pesó el material vegetal y se suspendió a un volumen de etanol al 96% cubriendo el material en su totalidad. En el caso del tallo se suspendió en 600 mL de etanol, la hoja en 250 mL. Se colocaron en un frasco ámbar, o bien, cubierto con aluminio para evitar la oxidación de compuestos fotosensibles. El lavado del solvente (etanol) se llevó a cabo por filtración al vacío, este paso se realiza 3 veces cada tres días y se vuelve a resuspender según el volumen requerido del solvente. Una vez recuperado el solvente de los tres lavados, se procede a medir la cantidad de extracto obtenido y se procesa en el rotavapor con la finalidad de concentrar los componentes extraídos de la materia vegetal y eliminar el etanol (Figura 1).

Se obtuvieron cepas donadas del IPN del departamento de bacteriología médica de la ENCB, las cuales se llevaron a fase logarítmica. Se hicieron inóculos de las cepas ATCC (*Vibrio*



Protocolo para la determinación de CMI del extracto de *M. oleifera*  
Por el Micrométodo de Alamar Azul

*cholerae* O1, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*), los cuales se ajustaron a una concentración al 0.5 de Nefelómetro de McFarlan en caldo LB.

En una placa costar de baja evaporación se inocularon el pozo 1 con 200  $\mu$ L de extracto de *Moringa oleifera* a una concentración de 50 mg/mL, del pozo 2 al 6 con 100  $\mu$ L de caldo LB para ambas muestras. Se extrajeron 100  $\mu$ L del pozo 1 al pozo 2 y así sucesivamente hasta el pozo 6 y se eliminaron los 100  $\mu$ L excedentes del pozo 6. Se agregaron 100  $\mu$ L de cada inóculo del pozo 1 al 6. Se incubaron durante toda la noche a 36°C. Posteriormente se agregaron a cada pozo 20  $\mu$ L de reactivo de Alamar Azul (reactivo óxido-reducción) para evidenciar los cultivos con bacterias vivas (color rojo) y con bacterias muertas color (azul).

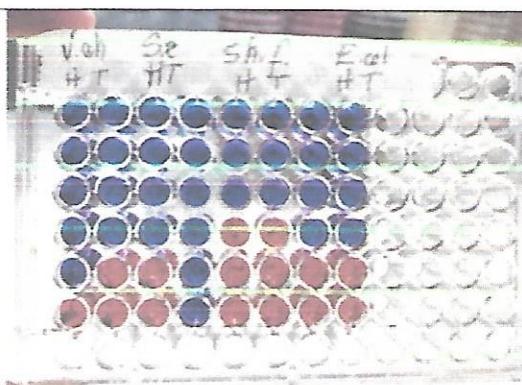
## Resultados

Solo se obtuvo el extracto alcohólico de *Moringa oleifera* de hojas y tallos porque fueron de los que se obtuvo suficiente muestra para hacer la extracción, no así con las hojas y semillas ya que el objetivo era evaluar los extractos de la misma planta. Sin embargo, los extractos de las hojas y de los tallos se realizaron por duplicado encontrando las siguientes CMI por el Micrométodo de Alamar Azul: para

*Vibrio cholerae* O1 la CMI para hojas fue de 3.125 mg/mL y en tallo fue de 6.25 mg/dL, para *Salmonella enterica* la CMI para hojas fue de 6.25 mg/mL y en tallo fue de 1.5625 mg/dL, para *Shigella flexneri* la CMI para hojas fue de 12.5 mg/mL y en tallo fue de 12.5 mg/dL y finalmente para *Escherichia coli* la CMI para hojas fue de 12.5 mg/mL y en tallo fue de 12.5 mg/dL Figura 2.

## Discusión

Las enfermedades diarreicas son un problema de salud que afecta a los países donde las condiciones socio económicas son desfavorables, afecta principalmente a niños, lactantes y personas de la tercera edad. Tal como lo describe Hernández y cols. (2011). En México es uno de los desafíos a vencer dada la distribución geográfica y las temperaturas extremas que favorecen este proceso infeccioso. Al aplicar nuestros protocolos para alcanzar nuestros objetivos planteados, obtuvimos nuestros resultados, los cuales demuestran que los extractos de *M. oleifera* de hojas y tallos tienen efecto bactericida, lo cual coincide con los resultados de Azuero y cols. (2016). Para la determinación de la CMI utilizamos el micrométodo de Alamar azul, el cual es un método óxido-reducción para revisar la viabilidad de las células bacterianas, para lo cual fue eficiente y cumplió su objetivo, este método es



		Concentración Mínima Inhibitoria de Extractos de <i>Moringa oleifera</i> por Alamar Azul							
Pozo	Concentración mg/ml	<i>Vibrio Cholerae</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Shigella flexneri</i>		<i>Escherichia coli</i>	
		Hojas	Tallo	Hojas	Tallo	Hojas	Tallo	Hojas	Tallo
Pozo 1	50								
Pozo 2	25								
Pozo 3	12.5								
Pozo 4	6.25								
Pozo 5	3.125								
Pozo 6	1.5625								

Concentración Mínima Inhibitoria de Extractos de <i>Moringa oleifera</i> por Alamar Azul							
<i>Vibrio cholerae</i>		<i>Salmonella enterica</i>		<i>Shigella flexneri</i>		<i>Escherichia coli</i>	
Hojas	Tallo	Hojas	Tallo	Hojas	Tallo	Hojas	Tallo
3.125	6.25	6.25	1.5625	12.5	12.5	6.25	6.25

Figura 2. CMI de los extractos de *M. oleifera* por el micrométodo de Alamar Azul en 4 cepas ATCC causantes de gastroenteritis

muy utilizado en países en desarrollo, en México Luna herra ha utilizado este método con mucho éxito.

## Conclusiones

Los extractos alcohólicos de *Moringa oleifera* tienen efecto bactericida sobre *Vibrio cholerae O1*, *Salmonella entérica*, *Shigella flexneri* y *Escherichia coli*. Se observó que las hojas tuvieron una CMI de 3.125 mg/mL por el micrométodo de Alamar azul para *Vibrio cholerae O1* menor que las obtenidas en el resto de las bacterias en estudio. Los extractos de tallo sobre *Salmonella entérica* tuvo una CMI de 1.56 mg/mL. También se observó que las hojas tienen mayor efecto bactericida que los tallos. El micrométodo de Alamar Azul es un método más objetivo y determina la CMI de manera cuantitativa.

## Referencias

- Padilla F., et al., 2016. Extractos de hojas de *Moringa oleifera* en la prevención y tratamiento de la diabetes mellitus, review. Rev Cubana de Medicina Natural y Tradicional.; 1(2)

2.- Mumtaz B., et al., 2017. The story of an amazing tree of life: " *Moringa oleifera*"-a review.

Epitome: International Journal of Multidisciplinary Research; 3(1).

- Taher MA, Nyeem MAB, Ahammed MM, Hossain MM, Islam MN. *Moringa oleifera* (Shajna): the wonderful indigenous medicinal plant. Asian J. Med. Biol. Res. 2017; 3(1):20-30.
- Hernández C., et al., 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, vol. 31, núm. 4.
- Martin C., et al., 2013. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. Pastos y Forrajes, Vol. 36, No. 2, abril-junio, 137-149.
- Pérez M., et al., 2015. Lilibeth Cabrera, Gisela Colina. In Vitro Antibacterial Activity of *Moringa Oleifera* Aqueous Extracts on Hospital Pathogenic Species. ISSN 2244-7334 / Depósito legal pp 2011, 02ZU3769 Vol. 5 N° 1 y 2 enero - diciembre: 141 - 145

- 7.- Suárez, M., et al., 2003. Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. *Biotechnol. Bioeng.* 81:13.
- 8.- Martín E. et al., 2007. Otros métodos para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología* - ISBN: 978-84-611-8776-8
- 9.- Azuero A., et al., 2016. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI* Vol. 9, Nº 20, septiembre 2016, pp. 11 - 18 ISSN 1390-4272 Impreso ISSN 2528-7737 Electrónico



Volume 103 May 2014 ISSN 0147-6512

# ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY

EDITOR:

Kurunthachalam Kannan



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

<http://www.elsevier.com/locate/ecoenv>



## Subacute intoxication with sodium nitrate induces hematological and biochemical alterations and liver injury in male Wistar rats

M.F. González Delgado<sup>a</sup>, A. González Zamora<sup>b</sup>, M.E. Gonsebatt<sup>c</sup>, E. Meza Mata<sup>d</sup>, G.G. García Vargas<sup>e</sup>, E.Y. Calleros Rincón<sup>a</sup>, R. Pérez Morales<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, C.P. 35010 Gómez Palacio, Durango, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n, Gómez Palacio, Durango, Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Mexico, D.F. C.P. 04510, Mexico

<sup>d</sup> Departamento de Patología, Unidad Médica de Alta Especialidad #71, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico

<sup>e</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez del Estado de Durango, Calzada las Palmas 1 y Sixto Ugalde. Col. Revolución, C.P. 35050 Gómez Palacio, Durango, Mexico

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

**Keywords:**

Nitrates  
Nitrite  
Methemoglobin  
Hypoxia  
Oxidative stress  
Liver injury

Nitrate pollution has emerged as a problem of great importance because in recent years, the levels of nitrate in soil and groundwater have increased, mainly through anthropogenic activities, such as the use of fertilizers in agriculture, domestic wastewater and septic tanks, industrial waste and deforestation. In animals, nitrate reduction to nitrite ( $\text{NO}_2$ ) and nitric oxide (NO) promote the formation of methemoglobin in the blood and the generation of highly reactive intermediates that induce oxidative stress in target organs. Exposition to nitrates has been associated with methemoglobinemia, reproductive toxicity, metabolic and endocrine alterations and cancer. This study analyzed acute intoxication with sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ) in male Wistar rats, aged 12–16 weeks. Four groups with  $n = 10$  rats each were formed: group 1 was the control, and group 2, group 3 and group 4 were treated for 10 days with intragastric doses of 19, 66 and 150 mg/kg/d  $\text{NaNO}_3$ , respectively. Hematological, metabolic and histological biomarkers in the liver were analyzed. The results showed high percentages of methemoglobin, an increase in  $\text{NO}_2$  in the plasma and an accumulation in the liver. Moreover, there were high counts of white blood cells and platelets in all treated groups. Additionally, there was an increase in the spleen weight in group 4. High levels of glucose, triglycerides, lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST) were observed and were significantly increased in groups 3 and 4. For oxidative stress biomarkers, there were increases in Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS), total GSH and SOD activity, mainly in group 4. Changes in mitochondrial activity were not significant. Histopathological analyses of the liver showed inflammation, infiltration of mononuclear cells, steatosis, ischemia and necrosis, and these findings were more evident at high doses of  $\text{NaNO}_3$  in which high of S-nitrosylation were found. In conclusion,  $\text{NaNO}_3$  was reduced to  $\text{NO}_2$ , thereby inducing methemoglobinemia, whereas other reactive species generated oxidative stress, causing hematological and metabolic alterations and injury to the liver.

### 1. Introduction

Nitrate pollution has emerged as a problem of great importance because in recent years, the levels of nitrate in water for human consumption have increased. Water quality has deteriorated considerably due to anthropogenic activity, such as the use of fertilizers in agriculture, domestic wastewater and septic tanks, industrial waste and

deforestation (Shukla and Saxena, 2018).

High concentrations of nitrates have been reported in the soil and groundwater of developed countries, such as in the USA, China, India, Korea and the European Union, where the European Commission has identified Nitrate Vulnerable Zones in which sustainable agriculture strategies are implemented to reduce nitrates (Ascott et al., 2017). However, in developing countries, up to 70% of the water used in

\* Corresponding author.

E-mail address: [rebecapms@ujed.mx](mailto:rebecapms@ujed.mx) (R. Pérez Morales).

human activities is returned to the environment without any treatment, which affects water quality in rivers and coastal areas, affecting the health of human populations and ecosystems (Rojas et al., 2015).

Studies on the spatial distribution of nitrates and the risk to human health were performed, and the main sources of contamination identified were domestic waste and agricultural activities. Additionally, a negative impact on health was observed, mainly in children and women (Rebolledo et al., 2016). The World Health Organization (WHO) established a permissible limit for the nitrate concentration in groundwater of < 50 mg/L as nitrate or < 11 mg/L as nitrate-nitrogen, whereas the Environmental Protection Agency (USA) guideline is < 45 mg/L as nitrate or < 10 mg/L as nitrate-nitrogen. These values are based on epidemiological evidence for methemoglobinemia in infants from short-term exposure.

By contrast, there are reports of the health benefits of nitrate intake. This is because it is a source for the exogenous production of NO that confers several beneficial cardiovascular effects on blood pressure, platelets, endothelial function and mitochondrial efficiency (Katri et al., 2017). However, these benefits were observed with nitrate ingested from the diet, mainly from green vegetables and during pharmacological administration; therefore, there is controversy about its safety, and the biological/biochemical role of the nitrate – NO<sub>2</sub> – NO pathway has been considered and analyzed.

Nitrate reduction is initiated in the mouth by bacteria with nitrate reductase enzymes, which are also present in the mammalian gut. In the mouth, approximately 25% of the nitrate ingested is reduced to NO<sub>2</sub>, and in the stomach, the acidic pH favors the formation of nitrous acid, which can decompose to different nitrogen oxides, such as nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and dinitrogen trioxide (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), depending on the redox environment and gastric content. The enterosalivary circulation of nitrate after absorption in the intestine has been reported, such that it can be reduced again to NO<sub>2</sub> in the mouth and restart the cycle (Pereira et al., 2013).

In the blood, NO<sub>2</sub> can bind to hemoglobin and oxidize ferrous iron in the heme site, forming methemoglobin, which cannot transport oxygen, thereby generating methemoglobinemia that is clinically significant; in 5–12% of methemoglobin cases, cyanosis is observed, and fatal toxicity occurs at levels of 30–50%. During the biotransformation of nitrate to NO<sub>2</sub>, other reactive nitrogen species (RNS) are produced, such NO<sup>·</sup> and peroxynitrite (ONOO<sup>·</sup>), and these react with proteins to form nitrotyrosine (Belcastro et al., 2017). Additionally, the formation of nitrosamines produced by chemical reactions of NO<sub>2</sub> with certain amines or amides to form N-nitroso compounds, such as N-nitrosodimethylamine (NDMA), N-nitrosodiethylamine (NDEA), and N-nitrosomorpholine (NMOR), which are likely carcinogenic to humans, were reported. Moreover, NDMA is hepatotoxic, causing fibrosis and tumors (Erkekoglu and Baydar, 2010).

Nitrogen oxides can affect the functionality of mitochondria, increasing reactive oxygen species (ROS) production by mitochondrial complex III, and other reactive molecules, such as superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>·</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical (OH) and singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Akopova et al., 2016). An imbalance between oxidative-nitrosative stress and the antioxidant response can lead to lipid peroxidation, protein carbonylation, modification of amino acids, DNA damage and S-nitrosylation of proteins that alter and compromise cellular function (Kurutas, 2016). Therefore, RNS and ROS induce the antioxidant response as a defense mechanism, and this includes an increase in the glutathione (GSH) level and the overexpression of detoxification enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) isoforms, catalase, thioredoxin, glutathione peroxidase and glutathione transferase (He et al., 2017).

Several studies have reported the effects of nitrate intoxication in animals and alterations in several biochemical parameters, such as glucose, cholesterol, creatinine, LDH, AST, ALT, and alkaline phosphatase (AP), and a high percentage of methemoglobin (Azzez et al., 2011). Moreover, biomarkers of oxidative stress were increased

(Bouaziz-Ketata et al., 2014). Another study on the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* provided strong evidence that relatively low nitrate-nitrogen levels of 80–100 mg/L were related to chronic effects, such as changes in swimming behavior, as well as slightly decreased survival and reduced total biomass (Davidson et al., 2014); however, in a study of *Danio rerio*, fish were treated with NO<sub>2</sub> in the range of 15–130 mg/L, growth restriction was observed, and there was a negative correlation between the NO<sub>2</sub> concentration and the growth rate (Voslářová et al., 2008).

In humans, the consumption of nitrates or NO<sub>2</sub> in drinking water and food has been associated with diseases, such as methemoglobinemia, some types of cancer, including stomach, liver, colon, lung, thyroid, kidney and non-Hodgkin lymphoma (Espejo-Herrera et al., 2015), cases of hypothyroidism and adverse reproductive effects (Kilfoyle et al., 2011). However, other studies have not found this association (Quist et al., 2018); therefore, there is controversy about its adverse effects at an epidemiological level.

In this study, low doses of NaNO<sub>3</sub> under the permissible limit (< 50 mg/L NO<sub>3</sub>) were administered to male Wistar rats. Short-term exposure was evaluated, and the methemoglobin percentage and NO<sub>2</sub> level in plasma and liver were quantified. Additionally, hematological and metabolic parameters were analyzed, and liver injury was assessed.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

Forty male Wistar rats 12–16 weeks of age and weighing between 100 and 150 g were included in this study. The animals were housed in a climatized environment at 25 ± 3 °C and 60% relative humidity with forced ventilation under automatic light cycles of 12 h, with free access to water and food (2014 Teklan Global, 14% protein). Rats were randomized and distributed in groups of 10 individuals. Group 1 was treated with 0.9% saline solution as a control, and the three experimental groups were treated with doses of 19 mg/kg (group 2), 66 mg/kg (group 3), and 150 mg/kg (group 4) of NaNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Darmstadt, Germany). Doses were administered daily for 10 days using an intragastric tube made of stainless steel N. 18 (Pfizer ® New York, NY, USA) to ensure that the exact doses were administered. The experimental protocol was authorized by the Bioethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (CICUAL ID – 210).

### 2.2. Sample collection

The rats were sacrificed by cervical decapitation. Blood samples were collected in tubes with EDTA to evaluate hematological parameters, methemoglobin percentage and to obtain plasma by centrifugation at 3000 g for 10 min. Blood samples were also collected without anticoagulant to obtain serum in which biochemical parameters were analyzed. Both the plasma and serum samples were stored at –80 °C until use. The rat livers and spleens were removed, cleaned and weighed. The livers were sectioned, and samples were rinsed and homogenized (10% w/v) in an appropriated buffer. These were centrifuged according to a previous protocol. The supernatants were stored at –80 °C until use. Other liver samples were fixed in 10% buffered formalin for histological analysis.

### 2.3. Methemoglobin and hematological analyses

The methemoglobin percentage was measured using the method reported by Sakata et al. (1982). Hematological parameters were evaluated in an automated Hematology Analyzer Cell-Dyn 1800. The hemogram reported the total red blood cells, white blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume and total platelet concentration.

**Table 1**Alteration in hematological parameters caused by subacute intoxication with NaNO<sub>3</sub> in male Wistar rats.

Parameter	Group 1 Control	Group 2 19 mg/kg	Group 3 66 mg/kg	Group 4 150 mg/kg	ANOVA F-value	P-value
Methemoglobin (%)	1.32 ± 0.7	6.09 ± 0.4 <sup>a,b,c</sup>	13.85 ± 2.8 <sup>a,b,d</sup>	19.52 ± 2.3 <sup>a,c,d</sup>	178.9	0.0001
White blood cells ( $10^3/\mu\text{L}$ )	3.8 ± 1.4	10.7 ± 3.6 <sup>a,c</sup>	13.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	15.2 ± 3.1 <sup>a,c</sup>	27.88	0.0001
Red blood cells ( $10^6/\mu\text{L}$ )	6.1 ± 1.3	5.7 ± 1.0	5.5 ± 1.6	6.5 ± 0.2	1.83	0.37
Hemoglobin (g/dL)	15.4 ± 1.1	14.9 ± 2.5	15.5 ± 3.1	14.7 ± 0.8	0.3	0.81
Hematocrit (%)	46.1 ± 16.0	42.1 ± 15.1	38.4 ± 11.6	45.5 ± 2.0	0.64	0.59
MCV (fl)	70.2 ± 3.2	66.5 ± 5.3	67.4 ± 6.3	70.1 ± 3.6	1.81	0.33
MCH (pg)	21.5 ± 1.1	32.5 ± 25.8	25.8 ± 8.3	22.6 ± 1.2	1.0	0.40
Platelets ( $10^3/\mu\text{L}$ )	761 ± 163	929 ± 53.1 <sup>a</sup>	991 ± 151 <sup>a</sup>	1061 ± 150 <sup>a</sup>	8.2	0.0003
NO <sub>2</sub> in plasma ( $\mu\text{g/mL}$ )	11.2 ± 2.9	13.3 ± 2.4	14.6 ± 3.0	15.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	3.8	0.02
Spleen weight (g)	0.97 ± 0.12	1.04 ± 0.09	1.11 ± 0.09	1.18 ± 0.18 <sup>a</sup>	4.5	0.008
Liver weight (g)	11.26 ± 0.73	10.72 ± 1.03	10.68 ± 1.15	11.05 ± 0.78	0.7	0.51

Results are presented as mean ± SD from groups of 10 rats. ANOVA degrees of freedom: between columns DF = 3, within columns DF = 36, total DF = 39.

MCV: Mean Corpuscular Volume, MCH: Mean Concentration of Hemoglobin.

<sup>a</sup> Significant differences respect to the control group (p < 0.05).<sup>b</sup> Significant differences of group 2 vs group 3 (p < 0.05).<sup>c</sup> Significant differences of group 2 vs group 4 (p < 0.05).<sup>d</sup> Significant differences of group 3 vs group 4 (p < 0.05).

## 2.4. Metabolic parameters

The metabolic parameters, glucose, cholesterol, triglycerides, LDH, ALT and AST, were analyzed in serum using the dry chemistry method with the automated Ortho Clinical Vitros 250 Chemistry System (Johnson & Johnson<sup>®</sup> New Brunswick, New Jersey, USA), and quality and quantification standards were used in each case.

## 2.5. Determination of nitrite

The NO<sub>2</sub> levels in plasma were determined using the method reported by Moshage et al. (1995). For the quantification of NO<sub>2</sub> in the liver, 100 mg of tissue from each animal was homogenized in phosphate buffer pH 7.0 and centrifuged at 3000 g for 10 min. Quantification was performed in the supernatant using spectrophotometry. For both, plasma and liver homogenates, a standard curve of NaNO<sub>2</sub> was constructed.

## 2.6. Biomarkers of oxidative stress

Liver samples, 100 mg of tissue from each animal were homogenized, followed by differential centrifugation to obtain fractions corresponding to the plasmatic membrane, cytoplasm and mitochondria. The cytoplasmic and mitochondrial activities of SOD were determined in the corresponding fraction with the assay ID: 706002 (Cayman Chemical Company Ann Arbor, Michigan, USA). This method estimates SOD activity via the dismutation of superoxide radicals and calculates values from a calibration curve of the standard SOD enzyme (Cu/Zn) from erythrocytes. Lipid peroxidation was determined by TBARS in membrane fractions with the assay ID: 10009055 (Cayman Chemical Company Ann Arbor, Michigan, USA), and a standard curve was constructed to calculate the concentration in each sample. The samples were analyzed in a DR 3900 spectrophotometer. The total glutathione was determined spectrophotometrically in the cytoplasmic fraction with the assay ID: 703002 (Cayman Chemical Company Ann Arbor, Michigan, USA), in which a standard GSSG curve was used to calculate the GSH concentration. Mitochondrial activity was determined using the MitoCheck Complex II/III assay ID: 700950 (Cayman Chemical Company Ann Arbor, Michigan, USA). Data are expressed as a percentage of the activity of complex II/III.

## 2.7. Histopathological studies

Liver samples were fixed in 10% formalin solution and processed in

a series of graded ethanol solutions. Then, they were embedded in paraffin and sectioned at 5  $\mu\text{m}$ . Five slides were prepared from each liver and were stained with hematoxylin-eosin. All sections were evaluated for the degree of liver injury. Five representative samples from each group were prepared and analyzed for S-nitrosylation using the ID - 10006518 test (Cayman Chemical Company Ann Arbor, Michigan, USA). The preparations were examined under a fluorescence microscope (Motic BA410) at 40  $\times$  magnification. Data were interpreted and validated by a histopathology specialist from the Unidad Médica de Alta Especialidad N.71 of the Instituto Mexicano del Seguro Social.

## 2.8. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Scientific, San Diego, CA, USA). All hematological, metabolic and oxidant stress data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test. The Spearman test was used to determine the correlation between the NaNO<sub>3</sub> administered, methemoglobin percentage and NO<sub>2</sub> in the plasma, and methemoglobin percentage. Statistically significant differences were considered at p < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Alterations in hematological parameters

The percentage of methemoglobin was increased in all treated groups (p = 0.0001), whereas significant differences in hematological parameters were observed for the white blood cell count (p = 0.0001), platelet count (p = 0.0003), and NO<sub>2</sub> level in the plasma (p = 0.02). Additionally, an increase in the spleen weight was observed (p = 0.008). Other hematological parameters did not show significant differences with respect to the control group (Table 1).

The correlation between the doses of NaNO<sub>3</sub> administered and the percentage of methemoglobin was determined and a  $r^2$  of 0.99 was obtained (p = 0.04). The correlation between the concentration of circulating NO<sub>2</sub> in the plasma and the percentage of methemoglobin was  $r^2$  = 0.49 (p = 0.008), indicating that the level of methemoglobin is proportional to the dose of nitrate administered and the amount of nitrite circulating in the blood.

### 3.2. Changes in metabolic parameters

Metabolic parameters were analyzed, and several values were

**Table 2**Changes in biochemical and hepatic biomarkers caused by subacute intoxication with NaNO<sub>3</sub> in male Wistar rats.

Parameter	Group 1 Control	Group 2 19 mg/kg	Group 3 66 mg/kg	Group 4 150 mg/kg	ANOVA F-value	P-value
Glucose (mg/dL)	101.7 ± 4.0	108.0 ± 6.5	113.6 ± 7.3 <sup>a,d</sup>	136.5 ± 10.3 <sup>a,t</sup>	35.7	0.0001
Cholesterol (mg/dL)	78.8 ± 16.8	78.2 ± 7.9	78.8 ± 14.3	84.0 ± 13.2	0.35	0.78
Triglycerides (mg/dL)	126.7 ± 24.0	126.7 ± 17.0 <sup>b,c</sup>	148.1 ± 16.2 <sup>b,d</sup>	170.0 ± 18.6 <sup>a,c,d</sup>	10.1	0.0001
LDH (U/L)	2493 ± 1034	3600 ± 1248 <sup>b,c</sup>	7028 ± 1758 <sup>a,b</sup>	5615 ± 1565 <sup>a,c</sup>	15.8	0.0001
ALT (U/L)	81.1 ± 18.0	78.4 ± 12.0 <sup>a,e</sup>	99.7 ± 12.9 <sup>a,b</sup>	96.3 ± 6.2 <sup>c</sup>	6.06	0.03
AST (U/L)	122.6 ± 37.9	158.0 ± 22.4	155.9 ± 45.7	175.0 ± 32.8 <sup>a</sup>	3.19	0.002
NO <sub>2</sub> in liver (µg/mL)	1.35 ± 0.19	1.58 ± 0.20 <sup>a,t</sup>	1.71 ± 0.18 <sup>a,d</sup>	1.95 ± 0.18 <sup>a,d</sup>	16.2	0.0001

Results are presented as mean ± SD from groups of 10 rats. ANOVA degrees of freedom: between columns DF = 3, within columns DF = 36, total DF = 39.

LDH: lactate dehydrogenase; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase.

<sup>a</sup> Significant differences respect to the control group ( $p < 0.05$ ).<sup>b</sup> Significant differences of group 2 vs group 3 ( $p < 0.05$ ).<sup>c</sup> Significant differences of group 2 vs group 4 ( $p < 0.05$ ).<sup>d</sup> Significant differences of group 3 vs group 4 ( $p < 0.05$ ).<sup>e</sup> NO<sub>2</sub> was determined in homogenates of liver.

significantly increased compared to those of the control group. For glucose levels, there was an increase in group 3 and group 4 ( $p = 0.0001$ ). For cholesterol levels, no significant differences were found among the groups; however, the triglyceride levels were increased in treated groups ( $p = 0.0001$ ), and the LDH levels showed a significant increase also ( $p = 0.0001$ ). For liver biomarkers, the ALT levels were increased ( $p = 0.03$ ), and the AST levels were only increased in group 4 ( $p = 0.002$ ). Additionally, NO<sub>2</sub> in the homogenates of liver tissue was determined and significant differences were found in all treated groups ( $p = 0.0001$ ) (Table 2).

### 3.3. Biomarkers of oxidative stress

The TBARS were determined, and an increase was found in groups 3 and 4 ( $p = 0.007$ ). SOD activity significant differences were found only in group 4, in both the cytosolic ( $p = 0.003$ ) and mitochondrial (0.04) fractions. For the total GSH levels, only a significant increase was observed in group 3 ( $p = 0.03$ ) (Table 3). Mitochondrial activity was measured in the liver tissue, and when the dose was increased, group 4 showed a tendency to decrease the activity of complex II/III; however, the differences were not significant (Fig. 1).

### 3.4. Injury to liver

Histopathological changes were observed in the liver according to the doses administered. In group 2, macrovesicular steatosis and sinusoidal dilatation and congestion were observed. In group 3, there was inflammation with the infiltration of mononuclear cells and microvesicular steatosis, whereas group 4 showed inflammation, focal microvesicular steatosis, irregular focal ischemia, vascular dilatation, infiltration of mononuclear cells and necrosis (Fig. 2). Additionally, the presence of S-nitrosylated proteins in the liver was observed and the signal was strongest in group 4 (Fig. 3). These findings are consistent

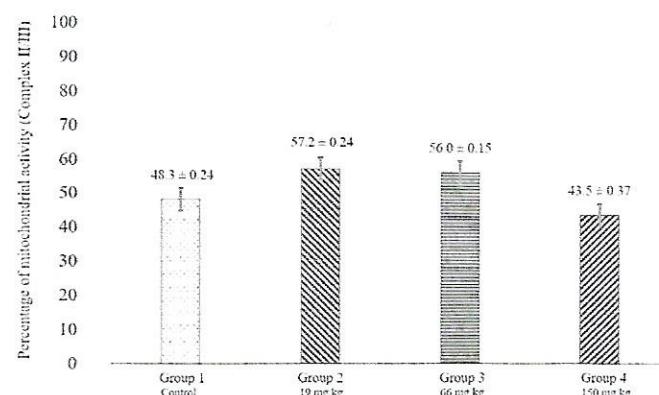


Fig. 1. Activity of mitochondrial complexes II/III in mitochondrial fraction of rat liver from animals treated with different doses of NaNO<sub>3</sub>. The bars represent the mean and SD of each group (n = 10).

with the doses administered, the amount of NO<sub>2</sub> found in the plasma and liver tissue, the high levels of oxidative stress biomarkers and the histopathological injury observed in the liver.

### 4. Discussion

Nitrate pollution has been extensively studied worldwide because it affects the quality of water supplied for human consumption and the health of ecosystems. It is well known that nitrates are precursors of highly reactive molecules, such as NO<sup>•</sup> and ONOO<sup>•</sup>, causing injury to many important biological molecules, including proteins, lipids and nucleic acids.

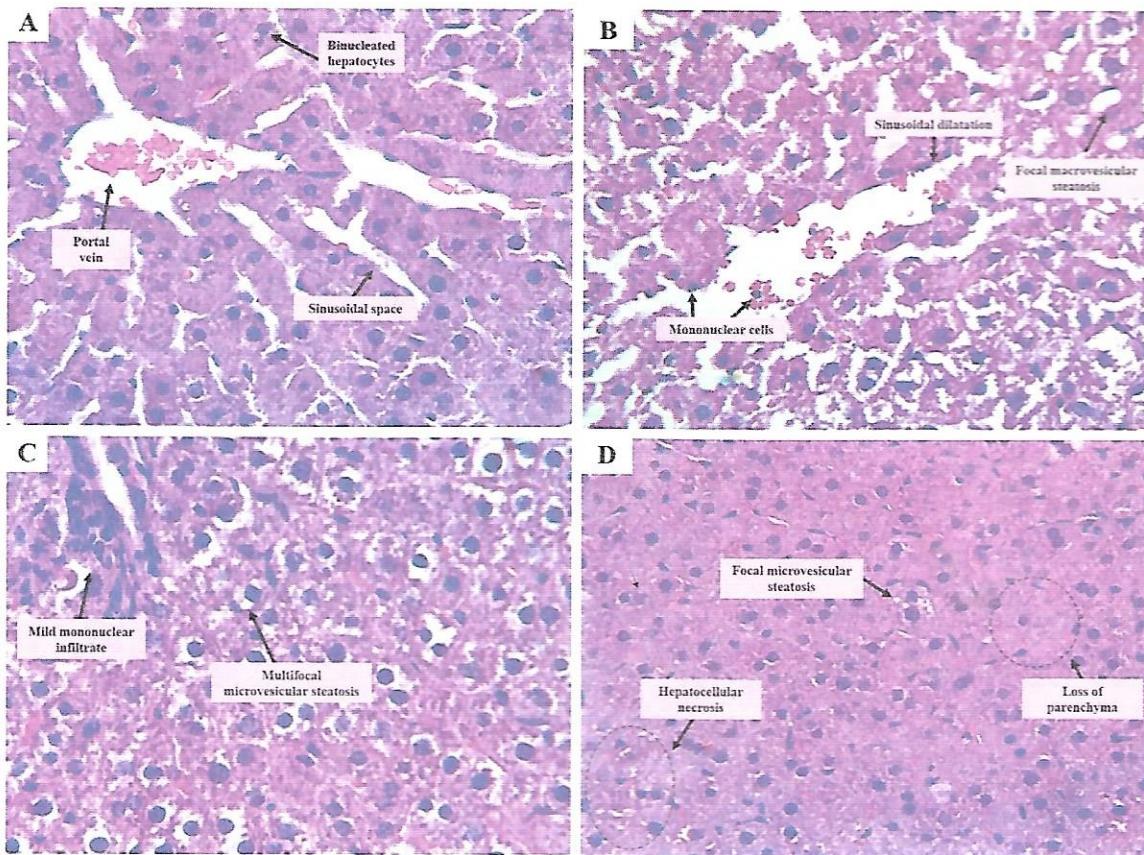
The WHO reported in the Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality (<http://WHO/SDE/WSH/>

**Table 3**Response in oxidative stress biomarkers to subacute intoxication with NaNO<sub>3</sub> in male Wistar rats.

Parameter	Group 1 Control	Group 2 19 mg/kg	Group 3 66 mg/kg	Group 4 150 mg/kg	ANOVA F-value	P-value
TBARS (µM/g)	25.7 ± 3.2	27.3 ± 3.9	31.7 ± 5.7 <sup>a</sup>	32.2 ± 4.6 <sup>a</sup>	4.61	0.007
SOD <sub>Cyt</sub> (U/mg prot)	2.7 ± 0.7	3.0 ± 0.3	3.34 ± 0.4	3.94 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.46	0.003
SOD <sub>Mit</sub> (U/mg prot)	105.9 ± 19.5	110.4 ± 9.5	108.0 ± 16.3	127.4 ± 20.2 <sup>a</sup>	3.04	0.04
GSH <sub>t</sub> (µM/g)	5.9 ± 1.6	6.7 ± 2.0	8.4 ± 2.5 <sup>a</sup>	8.1 ± 1.3	3.14	0.03

Results are presented as mean ± SD from groups of 10 rats. ANOVA degrees of freedom: between columns DF = 3, within columns DF = 36, total DF = 39.

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances measured in pellet corresponding to plasmatic membrane fraction of liver homogenates; SOD<sub>Cyt</sub>: cytosolic superoxide dismutase; SOD<sub>Mit</sub>: mitochondrial superoxide dismutase; GSH<sub>t</sub>: Total glutathione measured in cytoplasmic fraction of liver homogenates.<sup>a</sup> Significant differences respect to the control group ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 2.** Hematoxylin & eosin stained liver sections and injury caused by subacute intoxication with  $\text{NaNO}_3$ . Magnification  $40\times$ . Five slides were prepared from each liver and were stained with hematoxylin-eosin. Representative findings are shown. A) Group 1: hepatic parenchyma with vascular dilatation and minimal inflammatory changes. B) Group 2: hepatic parenchyma with mild focal macrovesicular steatosis, sinusoidal dilatation and mild congestion. C) Group 3: hepatic parenchyma with moderate multifocal microvesicular steatosis, mononuclear infiltrate with dilatation and congestion. D) Group 4: hepatic parenchyma with focal microvesicular steatosis, area of slightly irregular focal ischemia, dilation and evident congestion with infiltration of inflammatory mononuclear cells and irregular hepatocellular necrosis.

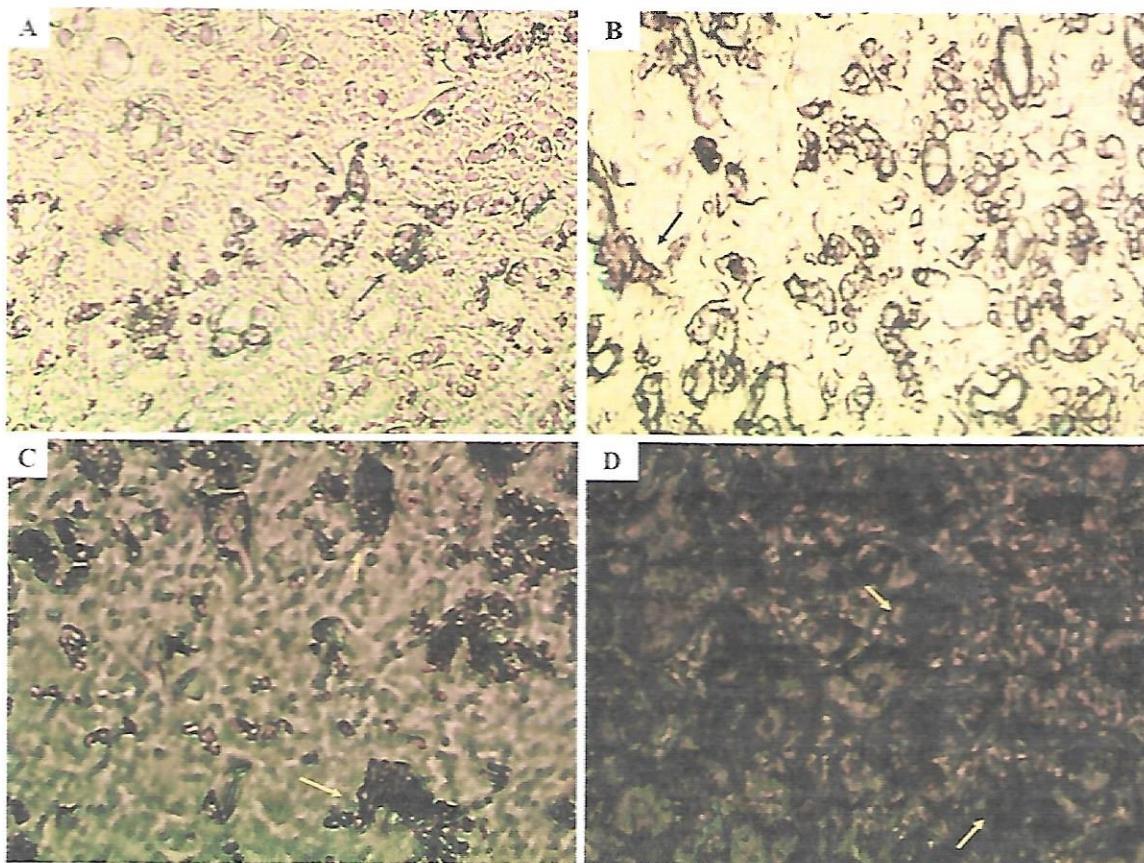
07.01/16/Rev/1) that acute oral toxicity of nitrates to laboratory animals is low to moderate. Median lethal doses (LD<sub>50</sub> values) are 1600–9000 mg/kg  $\text{NaNO}_3$  in mice, rats and rabbits, whereas ruminants are more sensitive to the effects of nitrate (450 mg/kg) because of high nitrate reduction in the rumen. With regard to short term exposure, a 13-week study was performed in which  $\text{NO}_2$  was administered to rats in drinking water. Dose-related hypertrophy of the adrenal zona glomerulosa was observed at doses in the range 100–3000 mg/L  $\text{KNO}_2$  (Till et al., 1988), and another study in rats identified inorganic nitrate as goitrogenic and anti-thyroidal (Mukhopadhyay et al., 2005). Although several studies were reported, most are focused on chronic exposure and high concentrations of nitrate in which metabolic alterations and organ and tissue injury were found, but it is not clear whether these alterations are permanent due to acute exposure or whether any response is induced to diminish the injury caused; therefore, this study was focused on acute exposure to low doses of  $\text{NaNO}_3$ .

The formation of methemoglobin is the most common adverse effect of nitrate intoxication in animals and humans, and levels above of 50% can be lethal due to hypoxia. In this study, dose-related increases in  $\text{NO}_2$  in the plasma and a high percentage of methemoglobin higher than the reference levels (3%) were reported for rodents. Purnell and Singh (2005) also reported an increase in the methemoglobin percentage in the blood of rats and dogs treated with different doses of oxidizing compounds, such as nitrates,  $\text{NO}_2$ , arsenic and lead, whereas El-Wakil et al. (2009) reported high levels of methemoglobin and  $\text{NO}_2$  in the plasma of rats treated with 50 mg/kg (550 mg/L)  $\text{NaNO}_3$  for 4 months. We found a correlation between the plasma  $\text{NO}_2$  levels and percentage

of methemoglobin. This is because  $\text{NO}_2$  can bind to hemoglobin, causing oxidation and preventing oxygen transport. Consequently, greater  $\text{NO}_2$  availability generates a higher percentage of methemoglobin, as reported by this study and other authors.

By contrast, Rodriguez-Estival et al. (2010) reported an increase in the size and weights of spleens from birds intoxicated for 14 days with 100 and 500 mg/L  $\text{NaNO}_3$ , whereas Messaadia et al. (2013) reported an increase in the spleen weight of rats treated with 400–600 mg/kg  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  for 30 days. These findings are consistent with our results. We found an increase in the white blood cell and platelet counts and an increase in the spleen weights of the groups treated with  $\text{NaNO}_3$ . In this respect,  $\text{NO}_2$  reduction to NO in vivo has been reported by Cosby et al. (2003), and NO is considered a pro-inflammatory mediator that induces inflammation due to overproduction in abnormal situations. The spleen functions to filter the blood and generate an immune response and acts as a reservoir for platelets (Borges da Silva et al., 2015); therefore, the increase in spleen weight may be indicator of an inflammatory processes, increasing white blood cells to eliminate oxidized erythrocytes (methemoglobin) and maintain blood homeostasis. We found no significant differences in red blood cells, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume or the mean concentration of hemoglobin.

For metabolic parameters, Azzez et al. (2011) found high levels of glucose, cholesterol, triglycerides, AST and ALT in rats treated with 200 mg/kg  $\text{KNO}_3$  for 6 weeks, whereas Messaadia et al. (2013) found high levels of glucose, cholesterol, triglycerides, uric acid, LDH, AST and ALT in rats treated with 400–600 mg/kg  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  for 4 weeks. Sezer et al. (2011) reported high levels of LDH, AST and ALT in



**Fig. 3.** Fluorescent microphotography of S-nitrosylation in the liver caused by subacute intoxication with  $\text{NaNO}_3$ . Magnification  $40\times$ . Five representative samples from each group were prepared and analyzed for S-nitrosylation assay. A: Group 1 (control). B: Group 2 (19 mg/kg  $\text{NaNO}_3$ ). C: Group 3 (66 mg/kg  $\text{NaNO}_3$ ). D: (150 mg/kg  $\text{NaNO}_3$ ). An increase in the S-nitrosylation signal was observed as the concentration of  $\text{NaNO}_3$  was augmented. The arrows indicate the aggregation of S-NO complexes.

pregnant cows chronically exposed to  $\text{NO}_3$  in their diet. In our study, high levels of glucose, cholesterol, triglycerides, LDH, AST and ALT were found in the groups treated with  $\text{NaNO}_3$ . These alterations can be attributed to changes in hepatic metabolism, because this organ is involved in the synthesis of lipids and the metabolism of glucose. An increase in amylase and phosphorylase activity allows the activation of glycogenolysis; therefore, blood glucose increases while glycogen in the liver decreases (Hijmans et al., 2014). Here, we found an increase in glucose and triglyceride levels, which suggests a metabolic adjustment in response to  $\text{NaNO}_3$  intoxication. This metabolic adjustment may involve the inhibition of aerobic metabolism due to the decrease in oxygen availability caused by methemoglobinemia, and by inhibiting this metabolic pathway, cells consume glucose via anaerobic metabolism (Eales et al., 2016). This effect could explain the increase in LDH activity. Furthermore, because aerobic metabolism is inhibited,  $\beta$ -oxidation decreases, and this could also explain the increase in serum triglyceride levels.

In addition, it was reported that strains of mice with hepatocyte-specific activation of hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit high levels of glucose, dyslipidemia and elevated triglyceride levels (Ramakrishnan and Shah, 2017). This is important because HIF responds to hypoxic conditions, and in our investigation, the increase in the percentage of methemoglobin produces a hypoxic condition because this form of hemoglobin cannot transport oxygen; therefore, it is possible that the metabolic alterations are also partially induced by the hypoxia caused by methemoglobinemia.

Nitrate is the precursor of NO, which leads to tissue injury and may be a direct effect mediated by NO itself or an indirect effect mediated by ROS, such as  $\text{ONOO}^-$  produced by the interaction of NO with  $\text{O}_2^-$  or  $\text{O}_2$ .

ROS and RNS can damage liver cells through the induction of inflammation, fibrosis, necrosis, apoptosis or even malignant transformation, but cells can trigger the antioxidant response to avoid cell damage (Muntané et al., 2013). In this respect, Rodriguez Estival et al. (2010) reported an increase in total GSH and SOD in the livers of birds treated with 500 mg/L  $\text{NaNO}_3$  for 14 days. By contrast, Bouaziz-Ketata et al. (2015) reported a decrease in the total GSH content and antioxidant enzyme activities of SOD, catalase, and glutathione peroxidase, in addition to an elevation in the level of TBARS in rats treated with 400 mg/kg  $\text{NaNO}_3$  for 50 days. Moreover, Anwar and Mohamed (2015) reported that GSH decreased in female rats treated with 500 mg/L  $\text{NaNO}_3$  for 28 days. In this study, we found high levels of TBARS as a product of oxidative damage, but we also found an increase in total GSH and cytosolic and mitochondrial SOD activity, suggesting that the  $\text{NaNO}_3$  administered, even at low doses, can induce oxidative stress that triggers the antioxidant response as a defense mechanism. Although NO modulates mitochondrial activity, in the present study, no changes were found in mitochondrial II/III complex activity. This is likely because the antioxidant response had a protective role in mitochondria because mitochondrial SOD was increased in all treated groups; however, this was only significant in group 4.

The liver metabolizes ~ 80% of substances that enter the body, and ALT and AST levels have been used as indicators of impaired liver parenchymal cells, suggestive of hepatic damage. Bouaziz-Ketata et al. (2014) reported high levels of LDH, ALT, AST and GGT in the plasma of rats treated with 400 mg/kg  $\text{NaNO}_3$  for 7 weeks. Moreover, they found hepatomegaly and necrosis with the infiltration of mononuclear cells. Anwar and Mohamed (2015) reported increases of ALT, AST and toxicity in the liver, as well as atrophy of the glomerular tuft and the

congestion of renal blood vessels in the kidneys of rats treated with 500 mg/L NaNO<sub>3</sub> for 4 and 6 weeks. Kattaia et al. (2017) reported increases in the ALT and AST levels, and disruption of the liver architecture, characterized by generalized vascular congestion, hepatocellular degeneration, vacuolations and the infiltration of inflammatory cells in rats treated with 200 mg/L NaNO<sub>3</sub> for 12 weeks. Fouad et al. (2017) found significant increases of ALT and AST, as well as degenerative changes in renal tubules with the congestion of glomerular capillaries and vacuolar degeneration of hepatocytes with congestion and dilation of the portal vein and blood sinusoid associated with inflammatory cell infiltration in rats treated with 1.5 mg/kg NaNO<sub>2</sub> for 28 weeks. Consistent with other authors, our results showed increases in ALT and AST, indicating injury in the liver caused by subacute intoxication with NaNO<sub>3</sub>. Furthermore, we also found an increase in NO<sub>2</sub> in liver homogenates. In this organ, the xanthine oxidoreductase enzyme reduces NO<sub>2</sub> to NO, leading to its overproduction and the generation of RNS that damages tissue through S-nitrosylation (Peleli et al., 2016). We also observed liver inflammation with the infiltration of mononuclear cells, dilatation, congestion, steatosis, ischemia and necrosis. In addition to the histological findings, the direct determination of S-nitrosylation in histological sections provides evidence of nitrosative stress, as was reported by Rocha et al. (2012), who observed S-nitrosylation in the glandular gastric mucosa of rats exposed to dietary nitrite.

Our findings are consistent with the literature; however, it is important to note that the doses administered in this study are lower than those used in previous studies; these studies mainly addressed chronic exposure, whereas our experimental model was based on subacute exposure and several biomarkers were studied. The conversion of doses administered at 19, 66 and 150 mg/kg NaNO<sub>3</sub> in rats corresponds to 2.3, 8.02 and 18.2 mg/L. These doses are within the international permissible limits for NO<sub>3</sub> in drinking water for human consumption, and most of the aquifers had levels < 50 mg/L as nitrate or < 11 mg/L as nitrate-nitrogen.

There are studies that have analyzed the impact of nitrate contamination on drinking water in the human population. Sadler et al. (2016) analyzed the health risk from exposure to nitrate in water from wells that supply humans in Indonesia and found concentrations in the range of 0.01–84 mg/L with an average of 20 mg/L NO<sub>3</sub>. They also evaluated the hazard quotient and found a high risk for birth defects in areas with the highest exposure. Zhai et al. (2017) studied wells that supply 11 cities in China and found ranges of 0.02–497 mg/L, with an average of 39.46 mg/L NO<sub>3</sub>. They estimated the hazard quotient and found that the most vulnerable populations comprise infants > children > women > men, who are mainly residents of rural areas where the highest NO<sub>3</sub> concentrations are found. Our findings provide information that may help revise the current limits for NO<sub>3</sub> because in some countries, control and management programs have been established to reduce the amount of NO<sub>3</sub> in soil and water, particularly in livestock areas that are the most vulnerable, to protect the human population, livestock and wildlife from the effects caused by nitrate pollution.

## 5. Conclusion

Subacute intoxication with NaNO<sub>3</sub> leads to increased levels of circulating NO<sub>2</sub> in the plasma and to accumulation in liver tissue. NO<sub>2</sub>-oxidized hemoglobin increases the methemoglobin levels that decrease oxygen availability. Blood homeostasis was maintained however increases in the sizes of the spleen and numbers of white blood cells and platelets were observed. There was a reduction in nitrate - NO<sub>2</sub> - NO-generated oxidative and nitrosative stress, evidenced by the high levels of TBARS in membranes and S-nitrosylation in liver sections, which allowed activation of the antioxidant response through an increase in the activity of the mitochondrial and cytoplasmic SOD enzymes and total GSH levels to minimize the damage caused by reactive species.

Similarly, cells responded to the decrease in oxygen availability and oxidative stress through a change in energetic metabolism, although no significant changes in mitochondrial activity were observed. There were increases in the glucose and lipid levels, and the high glycolytic rate increased lactate production metabolized by the enzyme LDH, which was also significantly increased. The alterations were dose dependent. In group 2, no significant changes were observed in the biomarkers of effects or liver damage, which suggests low toxicity and that the antioxidant response maintained homeostasis; however, in groups 3 and 4, toxicity increased with dose, and the presence of exposure markers, histopathological effects and liver damage were observed. In conclusion, the effects that have been reported at high doses and chronic exposure have also been established for short-term exposure by increasing the dose. It is necessary to conduct studies that analyze the molecular mechanisms to provide evidence for the toxicity of NO<sub>3</sub> and its risks, even at low doses.

## Acknowledgments

This study was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACYT-2014-01-241713) to RPM. MFGD had a fellowship from CONACYT (number CVU 598356, number 380099). The authors thank Verenice Hernandez Sifuentes and Sigifredo Hernández Sifuentes for their technical assistance in determining the hematological parameters and oxidative stress. The authors would like to thank the editor and reviewers for their valuable contributions toward improving this manuscript.

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Author contributions

RPM and MFGD conceived of and designed the study and conducted the experimental assays. MEG participated in the establishment of the experimental model. AGZ participated in the analysis and discussion of the results and preparation of the draft manuscript. EMM performed and validated the histological findings. GGGV and EYCR participated in the discussion. RPM, MFGD and AGZ wrote and approved final manuscript.

## References

- Akopova, O., Kotsiuruba, A., Korkach, Y., Kolchinskaya, L., Nosar, V., Gavenauskas, B., Serebrovska, Z., Mankovska, I., Sagach, V., 2016. The effect of NO donor on calcium uptake and reactive nitrogen species production in mitochondria. *Cell. Physiol. Biochem.* 39 (1), 193–204. <https://doi.org/10.1159/000445616>.
- Anwar, M.M., Mohamed, N.E., 2015. Amelioration of liver and kidney functions disorders induced by sodium nitrate in rats using wheat germ oil. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 8 (1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2014.11.004>.
- Ascott, M.J., Goody, D.C., Wang, L., Stuart, M.E., Lewis, M.A., Ward, R.S., 2017. Global patterns of nitrate storage in the vadose zone. *Nat. Commun.* 8, 1416. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01321-w>.
- Azzez, O.H., Mahmood, M.B., Hassan, 2011. Effect of nitrate poisoning on some biochemical parameters in rats. *Iraqi J. Vet. Sci.* 25 (2), 47–50.
- Belcastro, E., Gaucher, C., Corti, A., Leroy, P., Lartaud, I., Pompella, A., 2017. Regulation of protein function by S-nitrosation and S-glutathionylation: processes and targets in cardiovascular pathophysiology. *Biol. Chem.* 398 (12), 1267–1293. <https://doi.org/10.1515/bc-2017-0150>.
- Borges da Silva, H., Fonseca, R., Pereira, R.M., Cassado, A.A., Alvarez, J.M., D'Império Lima, M.R., 2015. Splenic macrophage subsets and their function during blood-borne infections. *Front. Immunol.* 6, 480. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00480>.
- Bouaziz-Ketata, H., Salah, G.B., Salah, H.B., Marrekchi, R., Jamoussi, K., Boudawara, T., Fakhfakh, F., Zeghal, N., 2014. Nitrate-induced biochemical and histopathological changes in the liver of rats: ameliorative effect of *Hyparrhenia hirta*. *Biomed. Environ. Sci.* 9, 695–706. <https://doi.org/10.3997/bes2014.105>.
- Bouaziz-Ketata, H., Salah, G.B., Mahjoubi, A., Aidi, Z., Kallel, C., Kammoun, H., Fakhfakh, F., Zeghal, N., 2015. *Hyparrhenia hirta*: a potential protective agent against hematotoxicity and genotoxicity of sodium nitrate in adult rats. *Environ. Toxicol.* 31, 1275–1284. <https://doi.org/10.1002/tox.21995>.
- Cosby, K., Partovi, K.S., Crawford, J.H., Patel, R.P., Reiter, C.D., Martyr, S., 2003. Nitrite



# REVISTA MEXICANA DE INDUSTRIA Y SALUD

*Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio, UJED*



Número 8  
Volumen 2  
Octubre 2018

### Cintillo Legal

Revista Mexicana de Industria y Salud, año 4 No. 7 (Mayo-Octubre), es una publicación semestral editada por la Universidad Juárez del Estado de Durango a través de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicada en Av. Artículo 123 S/N Colonia Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010. Tel (871) 7158810 ext. 118, [www.fcqgp.ujed.mx](http://www.fcqgp.ujed.mx), [editorremdis@gmail.com](mailto:editorremdis@gmail.com), [symposiumfcqujed@gmail.com](mailto:symposiumfcqujed@gmail.com). Editor responsable: M. C. Mónica Andrea Valdez Solana.

Reserva de derechos al uso exclusivo (en trámite), ISSN: 2594-1445, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número: Lic. Luis Antonio Montoya Jáquez, Departamento de Informática de la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio ubicado en Av. Artículo 123 S/N Col. Filadelfia Gómez Palacio, Durango. C.P. 35010, fecha de última actualización 30 de mayo de 2018.

**REMDIS**

**Certificado de Reserva de Derecho de Autor (en trámite)**

**ISSN: 2594-1445**

**Edición en la Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio**

**[editorremdis@gmail.com](mailto:editorremdis@gmail.com)**



## CONTENIDO

<b>EDITORIAL</b>	vi
- Los productos naturales como una alternativa en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.	
Dra. Concepción García Luján	
<b>BIOQUÍMICA</b>	1
- Interpretación de los datos cinéticos para una reacción enzimática.	
Sierra Campos Erick, Valdez Solana Mónica Andrea.	
<b>ALIMENTOS</b>	7
- Propiedades fitoquímicas de trozos de melón confitados.	
Gutiérrez Alonso Perla Marisela, Reza-Vargas María del Carmen, Meza Velázquez Jorge Armando, Aguilera-Ortiz Miguel	
- Caracterización fisicoquímica, betalainas y capacidad antioxidante en pitaya ( <i>Stenocereus griseus H.</i> ) y tuna roja ( <i>Opuntia ficus-indica</i> )	
Montelongo Campista Carmen Edith, Reza-Vargas María del Carmen, Sierra Campos Erick, Aguilera-Ortiz Miguel	
<b>QUÍMICA FARMACÉUTICA Y CLÍNICA</b>	20
- Elaboración de pasta oral antiparasitaria para equinos que cumpla con los requerimientos de estabilidad de NOM-073-SSA1-2005	
Rico del Río Adriana Erendira, Hernández González Sandra-Isabel, Martínez Romero Aurora, Alba Romero José de Jesús, Piñera Cuellar Alfredo, Lozano Morán Martín	
- Cuantificación de bifenilpoliclorados en suelo en diferentes áreas de la Comarca Lagunera	
Hernández González Sandra Isabel, Martínez Romero Aurora, Alba Romero José de Jesús, Cervantes Flores Maribel, Castro Hernández Sandra, Ortega Sánchez José Luis	
<b>CIENCIAS BIOMÉDICAS</b>	33
- Riesgo cardiovascular en sujetos VIH seropositivos con tratamiento antirretroviral: una revisión bibliográfica	
Miranda Pérez Alberto Alejandro, López Márquez Francisco Carlos, Roiz Bollain y Goytia Ana Paola, Urraza Robledo Arguine Ivonne	
- Prevalencia de <i>Treponema pallidum</i> en pacientes de la secretaría de salubridad y asistencia de Gómez Palacio, Durango	
Ochoa-García Perla Patricia, Esparza-González Sigfredo, Martínez-Romero Aurora, Hernández-González Sandra Isabel	
- Asociación entre el fenotipo del sistema de grupo sanguíneo AB0 y leucemias	
Ochoa-García Perla Patricia; Hernández-González Sandra Isabel; García-Contreras Luis Otoniel; Martínez-Romero Aurora; Jorge Núñez Pérez	
- Efecto hipoglucemiante y antiidiabético del <i>Aloe barbadensis Miller</i>	
Rodríguez-González V. M., Minjares-Fuentes J. R., Candelas-Cadillo M. G. Martínez García J.J, Femenia A.	
- Metahemoglobina y cuerpos de Heinz, en niños que consumen agua contaminada por nitratos	
Calleros Rincón Esperanza Yasmin, Avalos Calleros Bertha Yasmin, Morales Rebeca Pérez, González Zamora Alberto, Alba Romero José de Jesús, Olivas Calderón Edgar Héctor.	
<b>MICROBIOLOGÍA</b>	64
- Actividad antimicrobiana de <i>Ariocarpus fissuratus</i> en cepas patógenas representativas	
Bejarano-Castro M. G., De la Fuente-Salcido N, Linaje Treviño M., Hernández-Terán F, Valencia-Castro C. M	
- Evaluación del efecto bactericida del extracto etanólico de <i>Moringa oleifera</i> y determinación de la CMI por el método de alamar azul en microorganismos causantes de gastroenteritis.	
Flores Vielma Gonzalo Alonso, Ruiz Flores Pablo, Orozco Mora Virginia, Calleros Rincón Esperanza Yazmín, Hernández González Sandra Isabel, Martínez Romero Aurora, Alba Romero José de Jesús	
<b>CARTILLOS</b>	76
<b>PROBLEMA BIOQUÍMICO</b>	102
- Fisicoquímica	
Erick Sierra Campos y Mónica Andrea Valdez Solana	
<b>CRUCIGRAMA</b>	103
- Análisis instrumental.	
Erick Sierra Campos y Mónica Andrea Valdez Solana	
<b>RESPUESTA PROBLEMA ANTERIOR</b>	104
- Virología	
<b>RESPUESTA CRUCIGRAMA ANTERIOR</b>	105
- Bioquímica.	

# METAHEMOGLOBINA Y CUERPOS DE HEINZ, EN NIÑOS QUE CONSUMEN AGUA CONTAMINADA POR NITRATOS

<sup>1</sup>Calleros Rincón Esperanza Yasmín, <sup>2</sup>Avalos Calleros Bertha Yasmin, <sup>1</sup>Morales Rebeca Pérez,  
<sup>3</sup>González Zamora Alberto, <sup>1</sup>Alba Romero José de Jesús, <sup>1</sup>Olivas Calderón Edgar Héctor.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Químicas Gómez Palacio de la Universidad Juárez del Estado de Durango.  
Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, C.P. 35010, Gómez Palacio, Dgo., México

<sup>2</sup>Universidad Vizcaya de las Américas. Boulevard Venustiano Carranza Núm 4925 Esq. con Boulevard  
Nazario Ortiz Garza, Saltillo, Coah.

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas Gómez Palacio de la Universidad Juárez del Estado de Durango.  
Artículo 123 s/n Fracc. Filadelfia, C.P. 35010, Gómez Palacio, Dgo., México

\* Email: [peruallenrodriguez@gmail.com](mailto:peruallenrodriguez@gmail.com)

## Resumen

**Introducción.** En el área rural de Ciudad Lerdo, Durango, la contaminación del agua por nitrógeno de nitrato se da por la sobre-fertilización y la mala distribución de las excretas del ganado vacuno, llegando a sobrepasar los límites de la NOM 127 SSA, la cual estipula 10 mg/L de nitrógeno de nitrato, esta contaminación produce efectos deletéreos en la salud, como metahemoglobinemia, hipotiroidismo y diversos tipos de cáncer.

**Objetivo.** Determinar el porcentaje de metahemoglobina y cuerpos de Heinz en niños que consumen agua contaminada por nitratos.

**Material y métodos.** Es un estudio transversal, donde participaron 51 niños y 52 niñas de 1 a 12 años de edad, previo conocimiento del estudio y firma de la carta de consentimiento informado de sus padres, el análisis de agua fue por electrodo de ion selectivo, el porcentaje de metahemoglobina por el método de Shihana, y los cuerpos de Heinz mediante tinción con cristal de violeta.

**Resultados.** La concentración mínima de nitrógeno de nitrato fue de 12.8 y la máxima de 45mg/L. La media de metahemoglobina fue de 11.44 y 11.8 g/dL, la desviación estándar de 1.64 y 1.41 en niños y niñas respectivamente. **Conclusiones.** El consumo de agua contaminada por nitratos causa aumento de metahemoglobina y la presencia de cuerpos de Heinz.

**Palabras clave:** Agua, metahemoglobina, nitrato, cuerpos de Heinz.

## Abstract

**Introduction.** In the rural area of Ciudad Lerdo, Durango, water contamination by nitrate of nitrogen is due to overfertilization and maldistribution of cattle excreta, exceeding the limits of NOM 127 SSA 10 mg / L nitrogen. This pollution produces deleterious effects on health, such as methemoglobinemia, hypothyroidism and various types of cancer.

**Objective.** Determine the percentage of methemoglobin and Heinz bodies in children who consume water contaminated by nitrates.

**Material and methods.** It is a cross-sectional study, involving 51 children and 52 girls from 1 to 12 years of age, previous knowledge of the study and signing of the informed consent letter from their parents, the water analysis was by selective ion electrode, the percentage of methemoglobin by the method of Shihana, and the bodies of Heinz by means of violet crystal staining.

**Results.** The minimum concentration of nitrate nitrogen was 12.8 and the maximum concentration was 45mg / L. The mean methemoglobin was 11.44 and 11.8 g / dL, the standard deviation of 1.64 and 1.41 in boys and girls respectively.

**Conclusions.** The consumption of water contaminated by nitrates causes an increase in methemoglobin and the presence of Heinz bodies.

**Key words:** Water, methemoglobin, nitrate, Heinz bodies.

## Introducción.

Dentro de las actividades económicas que realiza el área rural de la Comarca Lagunera de Durango, se encuentra el cultivo de hortalizas para consumo humano y maíz forrajero para alimento del ganado vacuno. Debido a que es la cuenca lechera más importante de México, se han tenido que sobre-fertilizar los campos con sustancias nitrogenadas contribuyendo a la contaminación del acuífero, donde los niveles de nitrógeno de nitrato ( $\text{N-NO}_3^-$ ), rebasan los límites permitidos por la NOM 127 SSA, que marca, 10mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$  y en donde hay comunidades con concentraciones que van de 12.8 a 45mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$ . (Calleros et al. 2012).

Debido al ciclo del nitrógeno, la presencia de nitratos y nitritos en el ambiente se da de manera natural; sin embargo, las actividades humanas modifican sus concentraciones y pueden hacer que estos compuestos sean potencialmente peligrosos para la salud humana y animal. Las fuentes ambientales más importantes son el uso de fertilizantes nitrogenados, la disposición de excretas y desechos municipales e industriales. Aunque el nitrito es el compuesto tóxico, un factor determinante en la incidencia de la toxicidad es la concentración  $\text{N-NO}_3^-$  en el agua debido a que se forman a partir de los mismos. (Kilfoy, et al. 2013).

En modelos animales se ha reportado que en aves intoxicadas con aguas procedentes de pozos agrícolas se encontraron alteraciones significativas en células de la respuesta inmune, altos niveles de metahemoglobina, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa y lactato deshidrogenasa (Rodríguez-Estival et al. 2010).

El nitrato ingerido a través del agua de bebida o por alimentos se absorbe en el intestino delgado mediante transporte activo y otra fracción es bio-transformada por la microbiota del tracto gastrointestinal, mientras que los nitritos se absorben por difusión a través de la mucosa gástrica y la pared intestinal (Lundberg et al. 2008). Del nitrato ingerido aproximadamente el 5% es reducido a nitrito por la acción de las bacterias reductoras presentes en la cavidad oral y el 25% es parcialmente reciclado en las glándulas salivales, que concentran el nitrato a partir del plasma, este nitrato en la saliva también puede ser reducido a nitrito. Después de la absorción del nitrato y su secreción en los fluidos corporales es excretado en la orina en un lapso máximo de 5 horas después de la ingesta. En humanos cerca del 3% de la dosis de nitrato aparece en la orina como urea o amonio.

Como se mencionó anteriormente, los nitratos pueden ser reducidos a nitritos en el tracto digestivo del organismo, lo que produce la oxidación de la hemoglobina (Hb) a metahemoglobina (metaHb). La Hb se encarga del transporte del oxígeno a través de los vasos sanguíneos y capilares, mientras que la metaHb no es capaz de captar y ceder el oxígeno (Umbreit et al. 2007), la privación de oxígeno causada por la unión de nitratos y nitritos a la hemoglobina ocurre en los tejidos cuando el suministro de  $\text{O}_2$  a través del sistema cardiovascular es insuficiente para la demanda requerida por las células, generando hipoxia (Lou et al. 2010). La hipoxia se ha relacionado con diversos procesos patológicos sub-crónicos como alteraciones en las células sanguíneas, formación de cuerpos de Heinz, así como alteraciones en los parámetros bioquímicos y crónicos como alteraciones hepáticas y renales, así como la iniciación carcinogénica (Semenza et al. 2004).

El principal mecanismo de toxicidad de los nitritos es la oxidación del ion Ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) a ion Férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), lo que puede producir Metahemoglobinemia, efectos cardiovasculares y efectos respiratorios (Al-Lawati & Murch, 2012).

La principal enzima encargada de la reducción de metaHb en mamíferos es la nicotinamida dinucleótido hidrogenasa (NADH) dependiente de citocromo b5 reductasa (CB5R) y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato hidrogenasa (NADPH) presentes en los eritrocitos, las cuales catalizan la reducción de ion férrico a ion ferroso (Steinberg, 2009). El azul de metileno combate la metaHb activando las reacciones NADPH y acelerando el proceso de reducción de MetaHb. (Kunos et al. 2012). La NADH es una enzima ubicua que participa en la desnaturización de ácidos grasos, biosíntesis de colesterol y algunos metabolitos mediados por citocromo p450. La concentración de metaHb es mantenida normalmente alrededor del 1% de Hb por la acción de NADH dependiente de citocromo b5 reductasa (Bradberry et al. 2011). Este sistema tiene la capacidad de reducir la metaHb a desoxihemoglobina a una velocidad de 250 veces de la que oxida normalmente el grupo Hemo. La metaHb oxida lipoproteínas lo que conlleva a la promoción de arteriosclerosis, está también estimula las interleucinas 6 y 8 lo que intensifica la respuesta inflamatoria a nivel de tejido (Umbreit, 2007).

A diferencia de la forma ferrosa de la hemoglobina, en metaHb no se une el oxígeno fuertemente. La

Tabla 2. Promedio de edad, metahemoglobina y cuerpos de Heinz en la población de niños y niñas que consumen agua contaminada por nitratos.

Parámetro	Edad			MetHb* g/dL			Cuerpos de Heinz		
	n	Niños	Niñas	n	Niños	Niñas	n	Niños	Niñas
n	103	51	52	103	51	52	103	51	52
Mínimo	1	1	1	7.3	7.3	8.3	0	0	0
Máximo	12	12	12	13.8	13.5	13.8	3	3	3
Media	7.54	7.76	7.33	11.63	11.44	11.8	1.05	1.31	0.79
(DS)	3.28	3.5	3	1.53	1.64	1.41	1.25	1.32	1.14

\*Metahemoglobina

públicos y privados". La recolección de las muestras de agua se llevó a cabo en cada uno de los domicilios que tengan pozo y de la red de distribución, en número de dos, colocando cada una de las muestras en un recipiente de plástico debidamente etiquetado y herméticamente sellado con los datos: de domicilio, apellidos de la familia y fecha de recolección para ser analizado en el laboratorio, a una temperatura de 20°C, para su análisis por electrodo de ion-selectivo (ISE SympHony™, Merck).

#### Muestreo de sangre para determinar MetHb y cuerpos de Heinz

Por el método de venopunción se tomó una muestra de sangre a la población infantil de 1 a 12 años de edad, por ser la de mayor susceptibilidad a presentar metahemoglobinemia y la presencia de cuerpos de Heinz, para la determinación del porcentaje de MetHb se realizó por el método de Shihana, 2011. Brevemente, se prepara un hemolizado (D1) que posteriormente se emplea para realizar lecturas a 630 nm, agregando azida de sodio (D2); en otro volumen de hemolizado se agrega ferrocianuro de potasio (D3), después se agrega azida de sodio (D4). Utilizándose la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de methHb} = \frac{D1 - D2}{D3 - D4} \times 100$$

Para la cuantificación de los cuerpos de Heinz, se mezcló en un tubo de ensayo, volúmenes iguales de la solución de

crystal violeta y de la sangre problema, se incubó la mezcla, a 37°C, durante 5 minutos, posteriormente se hizo una extensión fina de la mezcla, se dejó secar la extensión, y se observó al microscopio.

#### Resultados.

En la tabla 1, se muestran los resultados encontrados de los niveles de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua de consumo humano donde se encontró una máxima 45 y una mínima de 12.8 mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> respectivamente.

Tabla 1. Niveles de nitratos en agua para consumo humano y agrícola en los poblados incluidos en el estudio

NOM 127 SSA 1991, valor de referencia: N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (10mg/L)

Localidad	Nivel de exposición de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)
Juan E. Gacía	24
Vicente Nava	13
El Salitral	13
La Goma	22
Salamanca	20
Sapiroriz	25
La Loma	45
El Peñón	12.8
Las Piedras	12.8
Las Cuevas	12.8

En efecto en la tabla 2 se muestran de inicio, la edad entre los niños y niñas estudiadas. Los niveles de Metahemoglobina y cuerpos de Heinz respectivamente. En relación a la edad se encontró

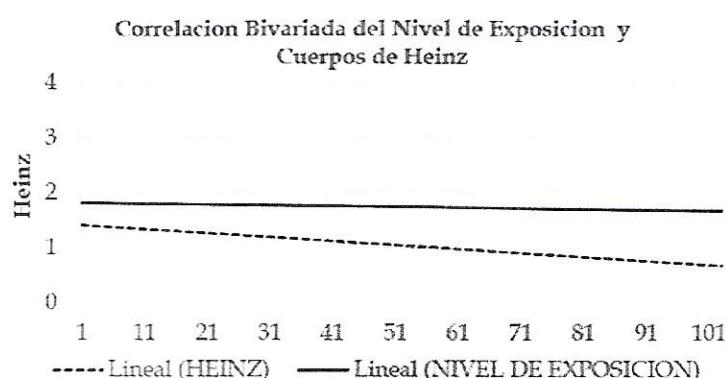


Figura 1. Correlación bivariada del nivel de exposición y cuerpos de Heinz

Tabla 3. Correlación de Pearson entre los cuerpos de Heinz y los niveles de exposición a nitratos

	Cuerpos de Heinz	Nivel de exposición
Heinz	Correlación de Pearson	1 0,778**
	Sig. (bilateral)	0.0001
	Suma de cuadrados y productos cruzados	160.757 84.214
	Covarianza	1.576 0.826
	n	103 103
	Correlación de Pearson	0.778** 1
Nivel de exposición	Sig. (bilateral)	0.0001
	Suma de cuadrados y productos cruzados	84.214 72.932
	Covarianza	0.826 0.715
	n	103 103

Tabla 4. Correlación entre los niveles de metahemoglobina y cuerpos de Heinz y en el total de la población

	Metahemoglobina	Cuerpos de Heinz
MetaHb*	Correlación de Pearson	1 -0.856**
	Sig. (bilateral)	0.000
	Suma de cuadrados y productos cruzados	25.456 -54.767
	Covarianza	0.250 -0.537
	n	103 103
	Correlación de Pearson	-0.856** 1
Cuerpos de Heinz	Sig. (bilateral)	0.000
	Suma de cuadrados y productos cruzados	-54.767 160.757
	Covarianza	-0.537 1.576
	n	103 103

\*Metahemoglobina

\*\*, La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

una diferencia altamente significativa ( $p<0.001$ ) siendo mayor la edad de los niños que de las niñas.

Por otro lado, al asociar las concentraciones de los niveles de exposición con los cuerpos de Heinz se encontró una correlación altamente significativa ( $p<0.01$ ;  $r=0.778$ ), ver fig. 1, y tabla 3.

Otro resultado interesante fue el encontrado de la asociación negativa entre la metahemoglobina y los Cuerpos de Heinz en los niños varones. En efecto la correlación de Pearson mostró una  $p<0.0001$  y una  $r= -0.856$ , ver tabla 4.

## DISCUSIÓN.

El nitrato al ser uno de los más frecuentes contaminantes de aguas subterráneas en áreas rurales debe ser controlado en el agua potable principalmente porque niveles excesivos pueden provocar metahemoglobinemia, o "la enfermedad de los niños azules". Aunque los niveles de Nitratos que afectan a los bebés no son peligrosos para niños mayores de 12 años y adultos, si indican un posible desarrollo de cánceres ya reportados en la literatura como el riesgo de diversas patologías (Dellavalle et al. 2013). Una exposición corta a agua potable con niveles de nitratos superiores al estándar permitido (NOM-127-SSA1-1994) es un problema potencial para la salud, especialmente para los lactantes alimentados con biberón. Los valores encontrados en nuestro estudio de  $\text{N-NO}_3^-$  en agua para consumo humano mostraron una importante tendencia de exposición media y alta lo cual indica un índice de exposición potencial de riesgo para la salud. Es poco probable que la ingesta de Nitratos por consumo de vegetales cause problemas de salud, ya que escasa cantidad de estos compuestos es reducida a nitrito. Los productos cárnicos aportan menos del 10% del nitrato en la dieta, pero contribuyen del 60 al 90% del nitrito consumido. Esto es básicamente porque los alimentos embutidos, tocino o alimentos ahumados se les añade nitrito de sodio. Frutas, granos y productos lácteos no aportan prácticamente nada de Nitratos o Nitritos a la dieta. (Jakszyn et al., 2006). La metahemoglobinemia puede desarrollarse por causas no tóxicas, tales como deficiencias enzimáticas congénitas. En el estudio presente desarrollado no se encontraron otras fuentes de exposición potencial entre los pobladores, sugiriendo esto que la contaminación encontrada en los sujetos es estrictamente por el consumo de agua con las concentraciones de nitratos mencionada. Los nitratos

contenidos en el agua potable, aún a concentraciones de 45mg/L, no son transferidos a la lecha materna, sino que son excretados por la orina.

El cuerpo humano ha sabido sacar provecho de los nitratos en la concentración a las que se hallan en los alimentos y en el agua potable. Un consumo normal de nitratos es de hecho inofensivo y los estudios experimentales sobre el potencial cancerígeno del nitrato per se han mostrado ser controvertidos.

El estudio más reciente se concentró sobre 70.000 personas en Bocholt, Alemania. La mayoría había consumido durante 28 años agua con 60 mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$ , y los testigos 10 mg/L. Se detectaron 527 casos de cánceres renales o urológicos, pero no se pudo mostrar evidencia de un efecto negativo significativo para los nitratos (Volkmer et al., 2005).

En este estudio se encontraron resultados muy interesantes, que incluso en la revisión bibliográfica no se mencionan. En nuestro trabajo, comprobamos con el análisis estadístico la metahemoglobina está relacionada negativamente con los cuerpos de Heinz tanto en niñas como en niños. Por otro lado, en relación al objetivo planteado, se encontró una asociación entre la concentración de los niveles de nitratos y los cuerpos de Heinz, resultado interesante porque no existen resultados que muestren esta asociación en poblaciones similares.

Otro de los datos que se muestran en la literatura es que se encuentra una tendencia a desarrollar metahemoglobinemia en niños varones y niñas; en este trabajo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos sexos, sin embargo, un dato interesante fue el encontrado para los cuerpos de Heinz determinándose una tendencia mayor para el sexo masculino con una diferencia altamente significativa. Es importante mencionar que la presencia de los cuerpos de Heinz puede indicar Talasemia Alfa, Anemia Hemolítica Congénita, Deficiencia de Glucosa-6-P-Deshidrogenasa o forma inestable de la Hemoglobina.

En nuestro estudio no se encontraron asociaciones entre la edad de los niños y la metahemoglobina. Otro hallazgo importante en este trabajo fue el que se encontró entre la asociación de la edad y los cuerpos de Heinz en el sexo femenino no así en los del sexo masculino.

UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA NACIONAL

# SALUD REPRODUCTIVA, MEDIO AMBIENTE Y GÉNERO

Un diálogo necesario



LOURDES CAMARENA OJINAGA  
ADRIANA LEONA ROSALES MENDOZA  
(coordinadoras)

*Salud reproductiva, medio ambiente y género. Un diálogo necesario*  
Lourdes Camarena Ojinaga y Adriana Leona Rosales Mendoza  
(coordinadoras)

---

Primera edición, julio de 2018

© Derechos reservados por la Universidad Pedagógica Nacional  
Esta edición es propiedad de la Universidad Pedagógica Nacional, Carretera al Ajusco  
núm. 24, col. Héroes de Padierna, Tlalpan, CP 14200, Ciudad de México, México.  
[www.upn.mx](http://www.upn.mx)

© Derechos reservados por la Universidad Autónoma de Baja California  
Esta edición es propiedad de la Universidad Autónoma de Baja California, Avenida Álvaro  
Obregón y Julián Carrillo s/n, col. Nueva, CP 21100. Mexicali, Baja California

Esta obra fue dictaminada por pares académicos.  
ISBN UPN 978-607-413-288-5  
ISBN UABC 978-607-607-472-5

HQ766.5  
.M6      Salud reproductiva, medio ambiente y género : un diálogo necesario /  
S35      Lourdes Camarena Ojinaga y Adriana Leona Rosales Mendoza. –  
2018      Mexicali, Baja California : Universidad Autónoma de Baja California ;  
             Ciudad de México, México : Universidad Pedagógica Nacional, 2018.

ISBN UPN 978-607-413-288-5  
ISBN UABC 978-607-607-472-5

1. Salud reproductiva – México. 2. Mujeres – Comportamiento sexual – México. 3. Partería – México – Historia. I. Camarena Ojinaga, Lourdes, coord. II. Rosales Mendoza, Adriana Leona, coord. III. Universidad Autónoma de Baja California.

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra, por cualquier medio, sin la autorización expresa de la Universidad Pedagógica Nacional y la Universidad Autónoma de Baja California  
Hecho en México.

---

<b>CAPÍTULO 4</b>	
<b>SALUD REPRODUCTIVA EN FAMILIAS AGRICULTORAS</b>	
<b>YUCATECAS: MODELO DE ABORDAJE MEDIANTE</b>	
<b>INVESTIGACIÓN-ACCIÓN PARTICIPATIVA.....</b>	<b>101</b>
<i>Norma Elena Pérez Herrera, María Teresa Castillo Burguete,</i>	
<i>Mayra Vera Avilés</i>	
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>ESTRATEGIAS PARA DETECTAR ALTERACIONES</b>	
<b>DEL CICLO MENSTRUAL EN ADOLESCENTES DE</b>	
<b>UNA COMUNIDAD AGRÍCOLA DE SAN LUIS POTOSÍ .....</b>	<b>125</b>
<i>Leticia Yáñez Estrada, Andrea Rodríguez López,</i>	
<i>Rebeca Mejía Saucedo y Jaqueline Calderón Hernández</i>	
<b>CAPÍTULO 6</b>	
<b>ALTERACIONES DEL CICLO MENSTRUAL</b>	
<b>Y ESTABILIDAD CITOGENÉTICA EN MUJERES</b>	
<b>JORNALERAS DEL VALLE DE SAN QUINTÍN .....</b>	<b>149</b>
<i>María Evarista Arellano García, Christine von Glascoe,</i>	
<i>Lourdes Camarena, Concepción Martínez</i>	
<b>CAPÍTULO 7</b>	
<b>CONTINUIDADES Y DISRUPCIONES EN LA SALUD</b>	
<b>SEXUAL Y REPRODUCTIVA DE MUJERES INDÍGENAS</b>	
<b>EN EL VALLE DE SAN QUINTÍN.....</b>	<b>179</b>
<i>Lourdes Camarena Ojinaga, Concepción Martínez Valdés, Christine Von</i>	
<i>Glascoe y María Evarista Arellano García</i>	
<b>CAPÍTULO 8</b>	
<b>IMPACTO DE LOS NITRATOS EN LA REPRODUCCIÓN</b>	
<b>FEMENINA.....</b>	<b>197</b>
<i>Esperanza Yasmín Calleros Rincón, Rebeca Pérez Morales</i>	
<b>SEMLANZA DE LAS AUTORAS .....</b>	<b>221</b>

---

## CAPÍTULO 8

### IMPACTO DE LOS NITRATOS EN LA REPRODUCCIÓN FEMENINA

*Esperanza Yasmín Calleros Rincón, Rebeca Pérez Morales*

#### INTRODUCCIÓN

Los problemas relacionados con la fertilidad han aumentado en los últimos años por la exposición a ciertas sustancias químicas que impactan en la salud reproductiva de mujeres y hombres afectando su capacidad de procreación. Las recientes consideraciones de género en el análisis de la salud sexual y reproductiva, han visualizado las distintas formas en que las construcciones sociales de lo masculino y lo femenino moldean de manera desigual los perfiles de salud y de participación de unas y otros en el cuidado de la salud reproductiva, lo cual se manifiesta no solo en términos de la exposición diferencial a los riesgos, sino de manera fundamental, en el poder de que disponen mujeres y hombres respectivamente, para enfrentar dichos riesgos, proteger su salud e influir en la dirección de ese proceso de cuidado.

Socialmente, se ha privilegiado de manera generalizada a los hombres y se ha situado a las mujeres en una posición de desventaja y subordinación, sobre todo en el contexto de los trastornos de

la fertilidad, los cuales traen consigo otros problemas emocionales como la frustración y muchas veces el abandono de la pareja, agravando el conflicto reproductivo con otros de tipo social y psicológico.

Este estudio analiza los efectos de la contaminación por nitratos en agua de consumo humano y su impacto en la salud reproductiva de las mujeres expuestas a estas sustancias en zonas rurales y agrícolas de Ciudad Lerdo, Durango, México.

Los fertilizantes nitrogenados son la principal fuente de contaminación de los acuíferos poco profundos, de los cuales proviene principalmente, el agua que se bebe en las poblaciones rurales (Guo *et al.*, 2010). Otra fuente de contaminación por nitratos se genera mediante la cría intensiva de animales (bovinos, porcinos o aves) que producen grandes cantidades de excretas consideradas una fuente importante de nitrógeno que eventualmente se transformará en nitratos capaces de contaminar las aguas superficiales y profundas de la zona (García, Molina, Moreno, Espigares y Fernández, 2014). Adicionalmente, la cantidad de óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) que se generan por el uso de combustibles fósiles en los vehículos automotores y en los procesos industriales es muy elevada, una proporción considerable de este nitrógeno regresa a la superficie terrestre en forma de nitratos (Hord, 2011).

Por otro lado, el uso de nitratos y de nitritos es frecuente en la elaboración (curado) de derivados de la carne como tocino, salchichas, jamón y otros embutidos que deben almacenarse por largo tiempo. El uso del aditivo evita el desarrollo de *Clostridium botulinum* y otras bacterias, además mantiene y aumenta el color y sabor característico de la carne formando pigmentos rosados, debido a la desnaturización de las proteínas y a la acción antioxidante para evitar un producto rancio (Xi *et al.* 2012). Entre los vegetales con mayores concentraciones naturales de nitratos están la lechuga, la coliflor, la espinaca y el brócoli, así como los tubérculos y las raíces comestibles (Santamaría, Elia, Gonnella, Parente y Serio, 2011).

En el cuerpo humano el nitrato se transforma en nitrito por las bacterias presentes en la saliva, el estómago, el colon, o en una

vejiga infectada (Ward, Heineman, Markin y Weisenburger, 2008), el nitrito reacciona con ciertos sustratos como aminas, amidas y aminoácidos para producir los compuestos nitrosos (NOC) que son algunos de los carcinógenos más potentes que se conocen. Estos se han asociado al riesgo que tienen más de 40 especies de animales, incluyendo primates superiores, de desarrollar cáncer en diversos órganos y sistemas, como la cavidad oral, el esófago, el estómago, el colon proximal, la glándula tiroides, la vejiga urinaria, o el sistema linfático (linfoma no Hodgkin) (McElroy *et al.*, 2008; Ward *et al.*, 2008, 2010; Grosse *et al.*, 2006; Hernández-Ramírez *et al.*, 2009; Aschebrook-Kilfoy *et al.*, 2013).

## NORMATIVIDAD

Se ha calculado una ingesta media de nitrato de 50–140 mg/día en Europa y de 40–100 mg/día en Estados Unidos (Mensinga, Speijers y Meulenbelt, 2003), ambas muy por debajo de la ingesta diaria admisible (IDA), la máxima establecida es 240 mg/día para una persona de 65 kg, según el Comité Científico de Alimentación Humana (CCAH). Algunas especies vegetales tienen gran capacidad de acumulación de nitratos (los productos de hoja, fundamentalmente), por lo que puede ser frecuente encontrar cantidades elevadas de nitratos en este tipo de productos (desde 1000 mg/kg de peso fresco hasta 3000–4000 mg/kg).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la mayoría de las personas adultas ingiere entre 20–70 mg de nitrógeno de nitrato por día, como se mencionó anteriormente, la mayor parte proviene de alimentos como lechuga, zanahoria, apio, remolacha, espinacas y verduras. Cuando los alimentos que contienen nitratos se consumen como parte de una dieta equilibrada, la exposición no se considera perjudicial, debido a que el ácido ascórbico y el beta-caroteno que se encuentran en frutas y verduras frescas, actúan como antioxidantes (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources

added to Food, 2017). Además, el ácido ascórbico reduce los nitratos a ácido nítrico en el tracto digestivo y evita la conversión de nitrito a N-nitrosaminas, por esta razón las hortalizas tienen efectos anticancerígenos (Hord, Tang, y Bryan, 2009). Desafortunadamente, el agua potable no se ingiere con antioxidantes o vitamina C, lo que aumenta el efecto de la exposición a los nitratos, cuando se contamina la fuente de agua.

Referente al agua para beber, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido 50 mg/L de nitrato (equivalente a 11 mg/L de N-nitrato) como límite máximo permitido de nitratos (World Health Organization, 2004), pero aun así puede contribuir de forma importante a la ingesta total de nitrato en algunas zonas. La agencia de protección ambiental U.S. EPA y la NOM-127-SSA1-1994 Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización señalan un nivel máximo de contaminación de 10 mg/L N-nitrato (equivalente a 45 mg/L de nitrato). El límite máximo de contaminación por nitrato en agua para beber se estableció para proteger contra metahemoglobinemia, o síndrome del bebé azul, al cual las y los infantes son especialmente susceptibles.

## BIODISPONIBILIDAD DE LOS NITRATOS

El grado de acumulación depende del metabolismo de los organismos y de otros factores como la temperatura, la luz solar, el nitrógeno disponible y la ingesta de elementos contaminados, entre otros factores. El nitrato ( $\text{N}-\text{NO}_3^-$ ) es reducido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por las bacterias de la saliva, atribuyéndose este mecanismo a algunas bacterias nitrato reductoras localizadas en la base de la lengua (Lundberg *et al.*, 2009), aproximadamente 25% del nitrato ingerido recircula en la saliva y 20% del mismo es convertido en nitrito. Del nitrito que llega al estómago 20% proviene de los alimentos, mientras que 80% proviene de la reducción del nitrato en la saliva.

Diversas investigaciones sobre la fisiología humana han proporcionado nuevas perspectivas en el papel del nitrato y sus productos fisiológicos, que han revelado que estos también se forman endógenamente en el cuerpo (Jansson *et al.*, 2008). La vida media del nitrato es de varias horas, en comparación con la vida media del nitrito que es de 20 a 30 min, mientras que la vida media del NO es menor a un segundo en circulación sanguínea (Petersson *et al.*, 2007). La formación de nitritos a partir de nitratos se realiza en el estómago y se incrementa cuando aumenta el pH, lo que ocurre como consecuencia de la infección crónica por *Helicobacter pilori*. Bajo circunstancias específicas, como la gastritis crónica, los nitritos pueden oxidarse en el estómago a agentes nitrosantes ( $N_2N_2O_4$ ) y reaccionar con aminas secundarias para formar compuestos N-nitrosos (NOC). La formación endógena representa entre 45% y 75% de la exposición total a NOC.

Después de unirse a la membrana del eritrocito, el nitrito es reducido a NO por la acción de la xantina oxidasa y NO sintetasa, además tiene un amplio rango de funciones fisiológicas como segundo mensajero, tanto en condiciones de salud como de enfermedad (Webb *et al.*, 2008).

El NO es un metabolito producido en el organismo, principalmente en los epitelios de los vasos sanguíneos, en donde ejerce una acción reguladora del tono vascular (Kim-Shapiro, Schechter, y Gladwin, 2006) y está implicado en diversos mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos como el estímulo nervioso, la activación de las plaquetas en la coagulación y septicemia, la activación de leucocitos en procesos infecciosos, alteraciones en enfermedades coronarias, diabetes mellitus, hipertensión pulmonar, prematurow y abortos, entre otros. (Manukhina, Downey y Mallet, 2006).

Los compuestos que no forman parte de la composición habitual del cuerpo humano son llamados xenobióticos. Los xenobióticos en la fase I son modificados mediante reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis y convertidos en productos más hidrosolubles debido a la formación de nuevos grupos funcionales de

carácter polar (hidroxilo, amino, carboxilo). Los citocromos P450 (CYP P450) son un grupo de enzimas que participan en la fase I del metabolismo oxidativo de los xenobióticos. Los CYP P450 son familias de hemoproteínas localizadas en el retículo endoplásmico de numerosas especies y se han identificado más de 2000 isoformas diferentes (Donato, 2006).

Los xenobióticos, o los metabolitos generados por las reacciones de la fase I se conjugan con moléculas endógenas de carácter polar, como el ácido glucurónico, el glutatión (GSH), el sulfato, de tal modo que son rápidamente excretados a través de la orina o la bilis. En este grupo se incluyen las glutatión-S-transferasas (GST), las N-acetil- transferasas (NAT), las sulfotransferasas (SULT), las NAD (P)-quinona oxidoreductasas (NQO) y las UDP-glucuronil-transferasas (UDP-GT). Estas últimas son las únicas localizadas en el retículo endoplásmico, a diferencia del resto de las enzimas de la fase II que se localizan en el citosol. La biotransformación frecuentemente resulta en la producción de un metabolito que es más tóxico que el compuesto original, a este proceso se le denomina bioactivación y se produce durante las reacciones de la fase I (Brown, Reisfeld y Mayeno, 2008). La bioactivación también permite la transformación de procarcinógenos en carcinógenos. Diversos estudios sobre los mecanismos bioquímicos de acción de las N-nitrosaminas han llegado a la conclusión de que la carcinogenicidad, la citotoxicidad y la mutagenicidad producidas por estos compuestos se debe a su conversión metabólica, a través de los CYP P450, en compuestos reactivos altamente electrofílicos. La activación metabólica de las N-nitrosaminas se inicia principalmente con la hidroxilación del átomo de carbono localizado en la posición alfa del grupo N-nitroso (Njeze, Dilibe e Ilo, 2014).

## ESTUDIOS QUE ASOCIAN EL N-NO<sub>3</sub> CON ALTERACIONES EN LA REPRODUCCIÓN FEMENINA

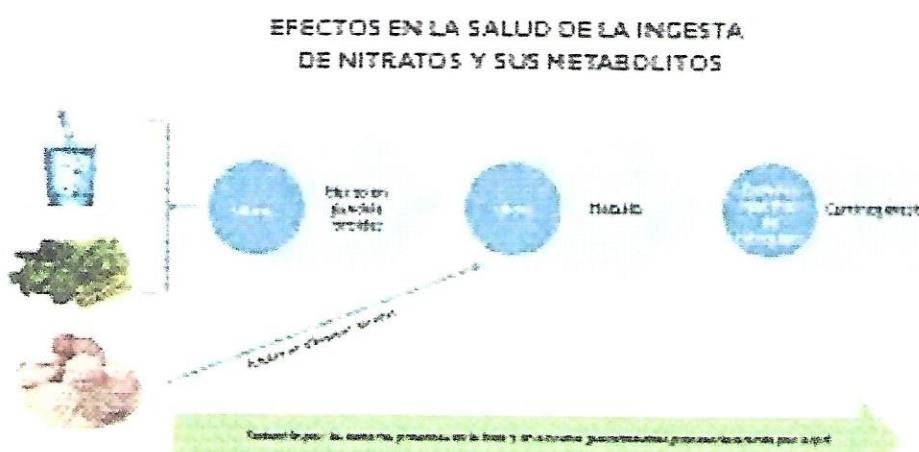
Estudios en humanos han demostrado un potencial vínculo entre la exposición a altos niveles de nitrato en el agua potable y la disfunción de la glándula tiroides, infecciones respiratorias recurrentes y resultados reproductivos adversos, como el aborto espontáneo.

Bruning-Fann y Kaneene (1993), reportaron que los compuestos nitrogenados pueden atravesar la placenta por un sistema de transporte activo, afectando al feto. Las mujeres embarazadas se consideran vulnerables a los efectos de la exposición a altos niveles de nitratos en el agua potable debido a su estado fisiológico alterado. El nivel de metaHb en sangre es el biomarcador utilizado en la investigación para evaluar la exposición a los nitratos (Manassaram *et al.*, 2010). Los compuestos N-nitroso son conocidos por ser potentes carcinógenos y se sabe que causan malformaciones congénitas en modelos animales. Además, estos compuestos se han asociado con resultados adversos en la reproducción y diversos tipos de cánceres en los seres humanos. Algunos estudios han sugerido que las nitrosaminas y precursores de N-nitroso (nitratos y nitritos) pueden tener un papel etiológico en diversos padecimientos en el proceso reproductivo, incluyendo defectos de nacimiento y abortos espontáneos. La exposición humana a compuestos N-nitrosos y sus precursores (nitratos y nitritos) puede ocurrir a través de fuentes exógenas, como la dieta, el consumo de agua, la ocupación, o exposiciones ambientales, y por medio de exposiciones endógenas resultantes de la formación de compuestos N-nitrosos en el organismo (Ward *et al.*, 2010).

Los niveles elevados de metaHb pueden conducir a la hipoxia anémica, una condición en la que hay un suministro inadecuado de oxígeno a los tejidos. La hipoxia puede derivar en efectos cianóticos o en la relajación del músculo liso; la cianosis y la relajación del músculo liso se observaron en ratas tratadas con 1500 ppm, o mayores concentraciones de nitrato de sodio en el agua para beber. La

en mamíferos es la NADH-dependiente de citocromo b5 reductasa (CB5R) presente en los eritrocitos, la cual cataliza la reducción de ion férrico a ion ferroso. Es una enzima ubicua que participa en la desnaturalización de ácidos grasos, biosíntesis de colesterol y algunos metabolitos mediados por CYP P450. La concentración de metaHb es mantenida normalmente alrededor del 1% de hemoglobina por la acción de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) dependiente de citocromo b5 reductasa. La unión de nitrito a la oxihemoglobina desplaza el oxígeno unido y los rendimientos de metaHb, peróxido de hidrógeno, y dióxido de nitrógeno inician la cadena de generación de radicales libres. El dióxido de nitrógeno oxida la hemoglobina a metaHb ferrosa, mientras que el peróxido de hidrógeno oxida la metaHb a un radical de hemoglobina ferrilo; la reacción de la hemoglobina ferrilo con nitrito también produce metaHb y dióxido de nitrógeno; estas dos últimas reacciones son las etapas de propagación de la cadena de radicales libres. La desproporción de dos radicales de dióxido de nitrógeno produce un anión nitrato que regenera un anión nitrito, y constituye el paso radical libre de terminación de la cadena (Al-Lawati y Murch, 2012). Los efectos de los nitratos y sus derivados se observan en la figura 1.

**Figura 1. Impacto de los nitratos y nitritos en la salud humana**



Fuente: Elaboración realizada por las autoras.

## EFFECTOS DE LOS NITRATOS Y SUS DERIVADOS EN LA SALUD

Como se mencionó anteriormente, los nitratos pueden ser reducidos a nitritos en el tracto digestivo del organismo produciendo la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (metaHb). La metaHb es una hemoglobina derivada donde el hierro ferroso se oxida, transformado de un estado bivalente a trivalente, lo cual ocasiona que la molécula no transporte oxígeno. La acumulación de metaHb en eritrocitos es por causas adquiridas o hereditarias; los casos de metaHb adquirida son frecuentes debido a intoxicaciones causadas por sustancias con acción de oxidación directa como los nitritos y nitratos o siguiendo algunas transformaciones metabólicas en el organismo, como algunas sustancias, incluidos el ácido salicílico, el piramidón, las sulfamidas o derivados usados en la industria (anilina, derivados de toluol y benzol). Como se mencionó anteriormente, la hemoglobina se encarga del transporte del oxígeno a través de los vasos sanguíneos y capilares, mientras que la meta-Hb no es capaz de captar y ceder el oxígeno; la privación de oxígeno ocasionada por la unión de nitratos y nitritos a la hemoglobina ocurre en los tejidos cuando el suministro de O<sub>2</sub> a través del sistema cardiovascular es insuficiente para la demanda requerida por las células, generando hipoxia. La hipoxia se ha relacionado con diversos procesos patológicos subcrónicos como alteraciones en las células sanguíneas y en los parámetros bioquímicos, formación de cuerpos de Heinz, y efectos crónicos como la iniciación carcinogénica (Lou *et al.*, 2010).

En condiciones normales en un individuo, el NO formado en los epitelios puede atravesar la membrana celular del eritrocito y combinarse con la oxihemoglobina formando metaHb que presenta una afinidad menor por el oxígeno, lo que provoca una menor oxigenación en los tejidos. En condiciones *in vitro* o de estasis sanguínea (en trombosis local), el equilibrio se rompe y los eritrocitos acumulan metaHb y NOx provocando serias alteraciones al organismo. La principal enzima encargada de la reducción de metaHb

realizó por colorimetría y por electrodo ion selectivo marca Orión. El idóneo fue el método de electrodo ion selectivo por la exactitud de sus resultados y porque las lecturas se pueden realizar en campo.

### Determinación de metahemoglobina

Se utilizó el kit de *Far Diagnostics* para la determinación espectrofotométrica de metaHb en sangre total. El método se basa en la lectura de la absorbancia de metaHb a 630nm. La adición de azida que es el anión con fórmula  $\text{N}_3^-$ , causa la eliminación de la metaHb, que es casi completamente transformada en metaHb–azida. La reducción de la absorbancia a 630 nm luego de la adición de la azida es proporcional a la concentración de hemoglobina.

## RESULTADOS

### Concentración de $\text{N}-\text{NO}_3^-$ en agua de la red de consumo humano

Para medir la exposición de los habitantes de las diez comunidades de estudio, se consideró una muestra de cada una de ellas, de los niveles –alto, medio y bajo– de exposición a nitratos por consumo de agua de la red de abastecimiento, encontrando parámetros muy por encima de lo que marca la NOM-127-SSA1-1994. En la tabla 1 se muestran los datos de  $\text{N}-\text{NO}_3^-$  encontrados en las localidades bajo estudio.

**Tabla I. Concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de las localidades de estudio**

Localidades nivel alto	Concentración mg/L N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
La Loma	22.6
Casas a la redonda	25.2 ± 10.10
Pozo No. 336	4.5
Casas a la redonda	12.3 ± 1.5
Sapioriz	39.9
Pozo No. 07 Dgo.	33.9
Casas a la redonda	22.1 ± 1.01
Localidades nivel medio	
Juan E. García	15.0
Casas a la redonda	15.8 ± 1.02
Localidades nivel bajo	
Las Piedras	7.2
Casas a la redonda	6.7 ± 1.0

Fuente: elaboración propia

### Características de las mujeres incluidas en el estudio

La media de edad fue de  $26.2 \pm 4.52$  para la zona de baja exposición, de  $26.71 \pm 4.62$  en la zona de exposición media y de  $25.91 \pm 4.84$  en la zona de alta exposición. Los niveles de metaHb fueron de  $1.43 \pm 0.43$ ,  $2.51 \pm 0.096$  y  $2.74 \pm 0.41$  para la zona de exposición baja, media y alta, respectivamente (tabla 2).

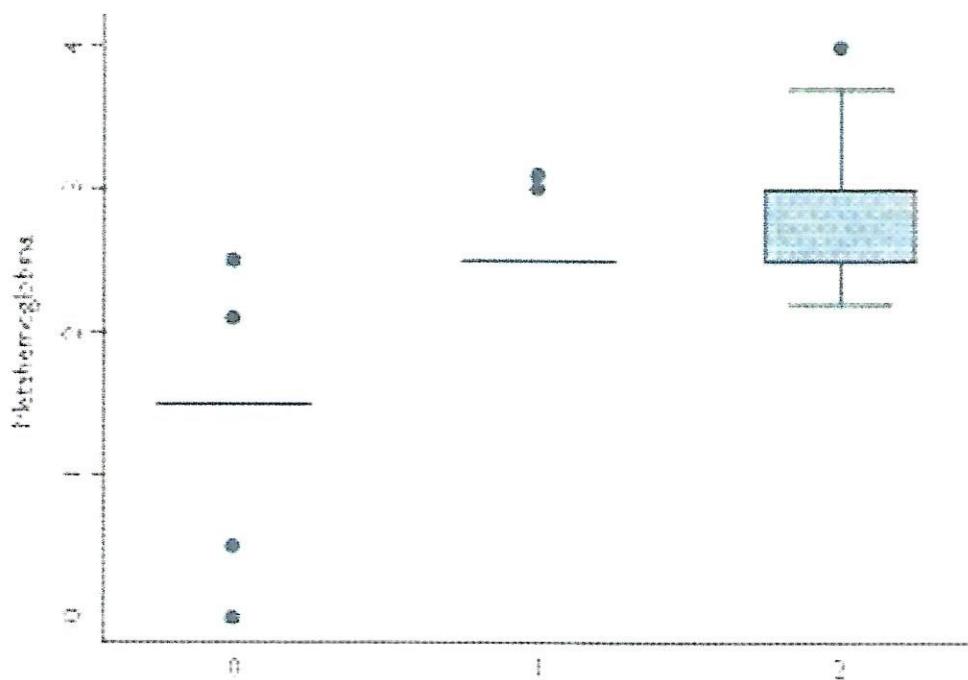
**Tabla 2. Niveles de metaHb y periodo menstrual en mujeres expuestas a nitratos en agua para beber.**

Parámetro Media ( $\pm$ DE)	Exposición baja n = 30	Exposición media n = 66	Exposición alta n = 79
Edad (años)	26.2 (4.52)	26.71 (4.62)	25.91 (3.56) (4.84)
Nivel de metaHb (%)	1.43 (0.43)	2.51 (0.096)	2.74 (0.41)
Edad de menarca (años)	12.33 (1.29)	12.5 (1.32)	12.41 (1.23)
Duración menstruación (días)	4.83 (1.41)	5.01 (2.22)	4.89 (1.54)
Cambios en la menstruación (n) (%)	14 (46)	39 (59)	37 (47)

Fuente: Elaboración propia

Se observó una diferencia significativa, entre grupos, según los niveles de metaHb (Kruskal Wallis  $p = 0.0001$ ) (figura 2). En los parámetros edad de la menarca, días que dura la menstruación y cambios en los ciclos menstruales no se encontraron diferencias significativas.

**Figura 2. Porcentaje de metahemoglobina en mujeres expuestas a nitratos**



Fuente: elaboración propia

hijos vivos sanos, prematuros, con malformaciones, muertos y abortos, en los que se observan algunas diferencias ( $p \leq 0.05$ ). La zona de alta exposición registró un elevado número de muertes y nacida(os) con malformaciones. Sin embargo, también se observó una alta incidencia de sífilis y gonorrea en la pareja sexual de las mujeres analizadas (tabla 3).

**Tabla 3. Características gestacionales en mujeres expuestas a nitratos**

Parámetro	Exposición baja n = 30	Exposición media n = 66	Exposición alta n = 79
Tiempo para embarazo en meses *	2.7 (2.29)	2.36 (1.79)	3.39 (2.29) **
Hijas(os) vivos sanos †	25 (83)	60 (90)	62 (78) **
Peso al nacer primer(a) hijo(a) ‡	2972.5 (1135)	3030 (980.9)	2907 (1160.9)
Hijas(os) prematuros §	1	0	1
Hijas(os) con malformaciones §	0	0	3 **
Hijas(os) muertos §	2	1	4 **
Abortos §	2 (6.6)	5 (7.5)	10 (12.6) **
Enfermedad venérea de la pareja sexual ‡*	7 (23.3)	4 (6)	29 (36.7) **

\*  $\mu$  ( $\pm$  DE)

† n (%)

‡ n

§ Sífilis, gonorrea

\*\*Kruskal Wallis p= 0.0001

Fuente: Elaboración propia

Se realizó un análisis bivariado agrupando las zonas de exposición baja–media que presentan datos similares y se compararon con los valores determinados en la zona de alta exposición. Se encontró que el porcentaje de metaHb se incrementa significativamente, según el nivel de exposición a nitratos ( $OR = 54.82$ , IC = 8.52 – 352.41), el tiempo para embarazo es mayor en la zona de alta exposición ( $OR = 1.22$ , IC = 1.06 – 1.41) y también el riesgo de aborto ( $OR = 1.84$ , IC = 0.66 – 5.08), aunque este último no fue significativo (tabla 4).

**Tabla 4. Asociación entre la exposición a nitratos con los niveles de metahemoglobina, abortos y tiempo para embarazo**

Parámetro	OR (IC)	Valor p
Porcentaje de metaHb	54.82 (8.52 – 352.41)	0.0001
Tiempo para embarazo	1.22 (1.06 – 1.41)	0.006
Número de abortos	1.84 (0.66 – 5.08)	0.23

Fuente: Elaboración propia

## DISCUSIÓN

El agua contiene diversos contaminantes que pueden ejercer un papel deletéreo en la reproducción humana, en este caso el N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> forma parte de uno de los contaminantes presentes en el agua para beber, sobre todo en zonas donde la ganadería y la agricultura cumplen un papel económico importante, por lo cual han tenido que sobrefertilizar con compuestos nitrogenados para cubrir la demanda de alimento forrajero para el ganado, contribuyendo así a la contaminación de los acuíferos. En el caso de la Comarca Lagunera de Durango, existen comunidades en donde las concentraciones de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> rebasan lo estipulado por la NOM-127-SSA1-1994. En este sentido, se encontraron comunidades con niveles de 25mg/L de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el agua de red destinada al consumo humano.

A las mujeres de los grupos de estudio se les determinó la presencia de metaHb que se incrementó significativamente en las pacientes expuestas a altas concentraciones de nitratos, por lo que el estudio coincide con otros autores en que el nivel metaHb es un biomarcador indirecto para la exposición a nitratos, como ya se ha reportado en otros estudios.

Asimismo evidenció que las mujeres residentes en zonas de alta exposición tardaron más tiempo en lograr su primer embarazo, que las mujeres que habitan en las zonas de media y baja exposición; igualmente en el nivel de exposición alto, se constató la presencia

de malformaciones en recién nacidas(os) –aunque las madres no especificaron cuáles–, hubo más recién nacidas(os) muertos y más abortos, lo que concuerda con los estudios realizados por Brender *et al.*, 2004 y Ward *et al.*, 2005.

Es importante notar que otro factor que también afecta la salud reproductiva de estas mujeres y puede repercutir en la salud de las y los recién nacidos, son las infecciones de transmisión sexual provenientes de sus parejas, lo cual también quedó documentado.

Además, existen muchas sustancias químicas capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario y, por tanto, provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie, tales como una amplia gama de compuestos orgánicos, sintéticos y metales pesados que se dispersan en el medio ambiente, por lo general en concentraciones demasiado bajas para inducir algún efecto fisiológico, sin embargo la combinación de contaminantes puede actuar de forma aditiva o sinérgica para alterar los sistemas fisiológicos, principalmente en el desarrollo del feto (Griesenbeck *et al.*, 2010).

## CONCLUSIONES

Las necesidades de abastecimiento de agua para consumo humano se han incrementado con el crecimiento de la población, propiciando que la extracción de agua subterránea se realice a mayor profundidad de excavación, con lo que también han crecido los riesgos de su contaminación. Adicionalmente, en la región de la Comarca Lagunera, que comprende municipios de los estados de Durango y Coahuila, se llevan a cabo actividades agrícolas y ganaderas que contribuyen a la contaminación del agua aportando nitratos, que son solo uno de los contaminantes en el agua potable que provocan efectos adversos en la salud humana.

La exposición crónica a nitratos produce alteraciones en los niveles de metaHb, ocasionando problemas para transportar oxígeno;

a su vez, la falta de este elemento puede limitar la vascularización de la placenta ocasionando abortos, como se ha reportado en modelos animales.

Los resultados de la investigación mostraron que la alta exposición a nitratos causó alteraciones en la salud reproductiva de las mujeres, tales como el incremento del tiempo para lograr el embarazo, la disminución en el porcentaje de hijas(os) vivos sanos, el aumento en el porcentaje de abortos, de hijas(os) nacidos muertos y de nacimientos con malformaciones. También, se encontró mayor proporción de mujeres con parejas sexuales con infecciones de transmisión sexual, lo que pudo contribuir a los resultados obtenidos, además de la alta exposición a nitratos en agua de beber.

Si bien los hallazgos de este estudio contribuyen al conocimiento de los efectos en la salud reproductiva de las mujeres expuestas a altas concentraciones del contaminante, incluso crónicamente, el estudio también lleva a concluir que la literatura actual no proporciona suficiente evidencia de una relación causal entre la exposición a los nitratos en el agua potable y los efectos adversos en los procesos de reproducción en las mujeres, de tal modo que hacen falta estudios que sustenten el impacto de este contaminante sobre la salud reproductiva de mujeres y hombres.

En el presente estudio también se observaron otras dificultades que tienen las parejas para lograr la fecundación y llevar a buen término un embarazo, una de ellas es la poca o nula participación del hombre en la solución de los problemas de reproducción y fertilidad. Se culpa a la mujer de ser infértil y se le discrimina, ejerciendo sobre ella violencia psicológica, física o el abandono, situación relacionada con el ejercicio de roles de género tradicionales, muy arraigados en las zonas rurales del país, donde la mujer se dedica exclusivamente a las labores del hogar y al cuidado de las y los hijos, teniendo una actitud de sumisión y obediencia hacia el varón.

El sector salud no debe estar ajeno a esta realidad y debe tenerla en cuenta en el diseño de sus políticas. Por esta razón se decidió tratar el tema, teniendo en cuenta que existen hoy más que nunca

las condiciones para aplicar la perspectiva de género en los planes y programas de salud.

## REFERENCIAS

- Al-Lawati, A. y Murch, N. (2012). Acquired methemoglobinemia. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 12(2), 237-241. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3327574/>
- Aschebrook-Kilfoy, B., Ward, M. H., Dave, B. J., Smith, S. M., Weisenburger, D. D. & Chiu, B. C.-H (Mayo, 2013). Dietary nitrate and nitrite intake and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, Vol. 54(5), 945-50. doi: <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.734613>
- Brender, J., Olive, J., Felkner, M., Suarez, L., Marckwardt, W., Hendricks, K. (2004). Dietary nitrates and nitrites, nitrosable drugs and neural tube defects. *Epidemiology*. 15(3), 330-336. R. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15097014>
- Brown, C., Reisfeld, B. & Mayeno, A. (2008). Cytochromes P450: a structure- based summary of biotransformation using representative substrates. *Drug Metabolism Reviews*, 40, 1-100. doi: <https://doi.org/10.1080/03602530701836662>
- Bruning-Fann. C. & Kaneene B. (1993). The effects of nitrate, nitrite and N-nitrous compounds on human health: a review. *Veterinary and Human Toxicology*, 35(6), 521-38. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303822>
- Bukowski, J., Somers, G. & Bryanton, J. (2001). Agriculture contamination of ground water as a possible risk factor for growth restriction of prematurity. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 43(4), 377-383.
- Donato, M. (2006). Citocromo P450. ¿Qué es el citocromo P450 y cómo funciona? En *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XIV Citocromo P450*, 29-62. Recuperado en <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/515/533>
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, (2017). Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA Journal*, 15(6):4787. Doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4787>
- García, E., Molina, M., Moreno, E., Espigares, M., Fernández C. (2014). Aspectos sanitarios de las fuentes no conectadas a la red de abastecimiento de agua para consumo humano. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 14(1), 1179-89.
- Griesenbeck, S., Brender, J., Sharkey, J., Steck M., Huber, J., Rene, A. ... & the National Birth Defects Prevention Study. (2010) Maternal Characteristics associated with the dietary intake of nitrates, nitrites and nitrosamines in woman