

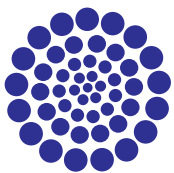
5to.



Encuentro de  
Jóvenes Investigadores  
en el Estado de Durango



PARA TODOS  
**Dgo**



CONACYT

PARA TODOS  
**Dgo**

CONSEJO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA

# EL CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DEL ESTADO DE DURANGO

Otorga la presente

*Constancia*

A:  
*Rebeca Pérez Morales*

Por su destacada participación como Asesora, en el  
**5to. ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES**

Realizado el 12 de Octubre en el Centro de Convenciones, Holiday Inn

**DEL PROYECTO TITULADO**

Biomarcadores antropométricos, metabólicos y polimorfismos  
de LEP y LEPR en mujeres con cáncer de mama y su  
posible implicación en la respuesta a la quimioterapia

**EN EL ÁREA DE:**

**MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD**

Durango, Dgo., a 12 de Octubre de 2018

**Dra. Juliana Morales Castro**

Directora General del Consejo de Ciencia  
y Tecnología del Estado de Durango





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

# Constancia

A:

**PÉREZ MORALES REBECA**

Por su asistencia a la I Jornada Nacional de Investigación en Salud Durango 2017  
Los días 30, 31 de Agosto y 1 de septiembre de 2017  
Duración 16 horas con valor curricular

**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



**Objetivo:** Contribuir a la difusión de los resultados de la investigación en el área de salud, así como promover el fortalecimiento del desarrollo de la investigación científica nacional.

Dirección de Enseñanza, Capacitación, Calidad e Investigación en Salud		
	<b>HORAS</b>	<b>CREDITOS</b>
<b>TEORIA</b>	<b>16</b>	<b>2</b>
<b>PRACTICA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>TOTAL</b>	<b>16</b>	<b>2</b>
Folio: 3293		
		
Coordinación Estatal de Capacitación		

	<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>HORAS</b>
1	Diagnóstico molecular: Biología molecular aplicada en la práctica clínica.	1
2	Gestión de recursos de financiamiento para la investigación	1
3	Tomando mejores decisiones clínicas basadas en evidencia científica	1
4	Consentimiento informado en la práctica clínica y la investigación	1
5	Investigación y Desarrollo de Medicamento"	1
6	Alcances de la Inmunogenética en México y su aplicación en Trasplantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas: Registro Mexicano de Donadores Altruistas de Médula Ósea"	1
7	Exposición de trabajos de investigación en las modalidades de Poster Científico y Ponencias orales del XV Concurso de investigación.	10
	Horas crédito	16



Sociedad Mexicana de Genética AC

# Congreso Nacional de Genética 2018



*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: Ríos-Sánchez E, Rubio Lightburn J, Petrosyan P, Pérez-Morales R**

POR HABER OBTENIDO EL **PRIMER LUGAR** EN EL CONCURSO DE CARTELES DE MAESTRÍA CON EL TRABAJO:

CUANTIFICACIÓN DE ADUCTOS EN DNA DE LINFOCITOS DE FUMADORES SANOS, PACIENTES CON CÁNCER PULMONAR O EPOC, Y SU ASOCIACIÓN CON VARIANTES ALÉLICAS DE RIESGO.

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





**5to.**  
Encuentro de  
Jóvenes Investigadores  
en el Estado de Durango



PARA TODOS  
**Dgo**



PARA TODOS  
**Dgo**

CONSEJO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA

EL CONSEJO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
DEL ESTADO DE DURANGO

Otorga el presente

*Reconocimiento*

A:

**Alicia Sophia Pulido González**

Por haber obtenido el

**TERCER LUGAR**

en el Área de:

**MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD**

en el

**5to. ENCUENTRO DE JÓVENES INVESTIGADORES**

**CON EL PROYECTO TITULADO**

“Biomarcadores antropométricos, metabólicos y polimorfismos de LEP y LEPR en mujeres con cáncer de mama y su posible implicación en la respuesta a la quimioterapia”

Durango, Dgo., a 12 de Octubre de 2018

**Dra. Juliana Morales Castro**  
Directora General del Consejo de Ciencia  
y Tecnología del Estado de Durango



DURANGO  
Consejo de Ciencia  
y Tecnología





Instituto Politécnico Nacional  
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango  
Sociedad Latinoamericana de Farmacogenómica y Medicina Personalizada



Otorgan la presente

# CONSTANCIA

a:

SANTILLÁN SIDÓN A. PATRICIA; VÁZQUEZ BOUCARD CELIA;  
PÉREZ MORALES REBECA; ANGUIANO VEGA GERARDO A.;  
RUIZ BACA ESTELA; OLIVAS CALDERÓN EDGAR H.

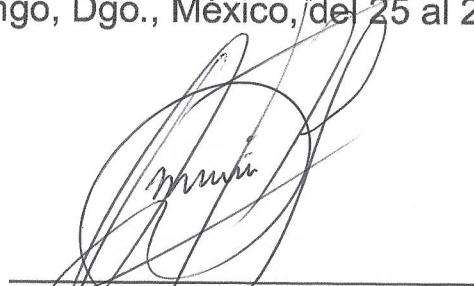
Autores del trabajo:

**“Relación entre la Actividad de Glutación S- Transferasa GST y Presencia de Polimorfismos de los Genes *GSTM1*, *GSTT1* en Trabajadores Mexicanos Expuestos Ocupacionalmente a Plaguicidas” Clave:TXG802**

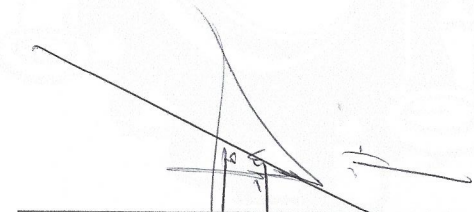
Por su participación en la sesión de posters en el  
*2do Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada*  
Realizado en Durango, Dgo., México, del 25 al 28 de octubre de 2017



Dr. Eduardo Sánchez Ortiz  
Director de CIIDIR IPN Unidad Durango



Prof. Dr. Luis Quiñones  
Presidente de la SOLFAGEM



Dr. Ismael Lares-Asseff  
Presidente del Comité Organizador



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, Edgar H. Olivas Calderón, Ollin Celeste Martínez Ramírez, Julieta Rubio.**

Por haber obtenido **SEGUNDO LUGAR** 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 la categoría: **INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

en el XV Concurso de Trabajos de Investigación en Salud

realizado en el marco 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



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

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

# Constancia

A:

**Gandarilla Esparza Diana Dennys, Calleros Rincón Esperanza Yasmin,  
Pérez Morales Rebeca**

Por su participación con el trabajo:

**ALTERACION EN NIVELES DE HORMONAS TIROIDEAS POR LA PRESENCIA DE POLIMORFISMOS  
rs965513 Y rs1867277 DEL GEN FOXE1**

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



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

# Constancia

A:

**González Delgado MF, Gonsebatt Bonaparte ME,  
Pérez Morales R.**

---

Por su participación con el trabajo:  
**Efectos de la intoxicación aguda con NaNO<sub>3</sub> a nivel hematológico,  
metabólico y tisular**

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



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**

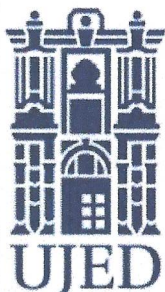
Gobernador del Estado de Durango

**Dr. César Humberto Franco Mariscal**

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

Victoria de Durango, Dgo. a Agosto de 2017





UNIVERSIDAD JUAREZ DEL ESTADO DE DURANGO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



## Constancia

**A:** Santillán Sidón A. Patricia, Vázquez Boucard Celia, Pérez Morales Rebeca, Ruiz Baca Estela, Olivas Calderón Edgar H, Anguiano Vega Gerardo A.

Por obtener el primer lugar en el área de investigación en salud en la  
modalidad de cartel con el trabajo titulado:

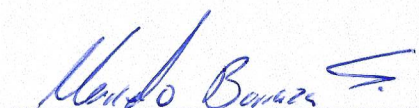
**“Análisis de biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad genética en  
trabajadores expuestos ocupacionalmente a plaguicidas”**

### II JORNADA ACADÉMICO - CIENTÍFICA

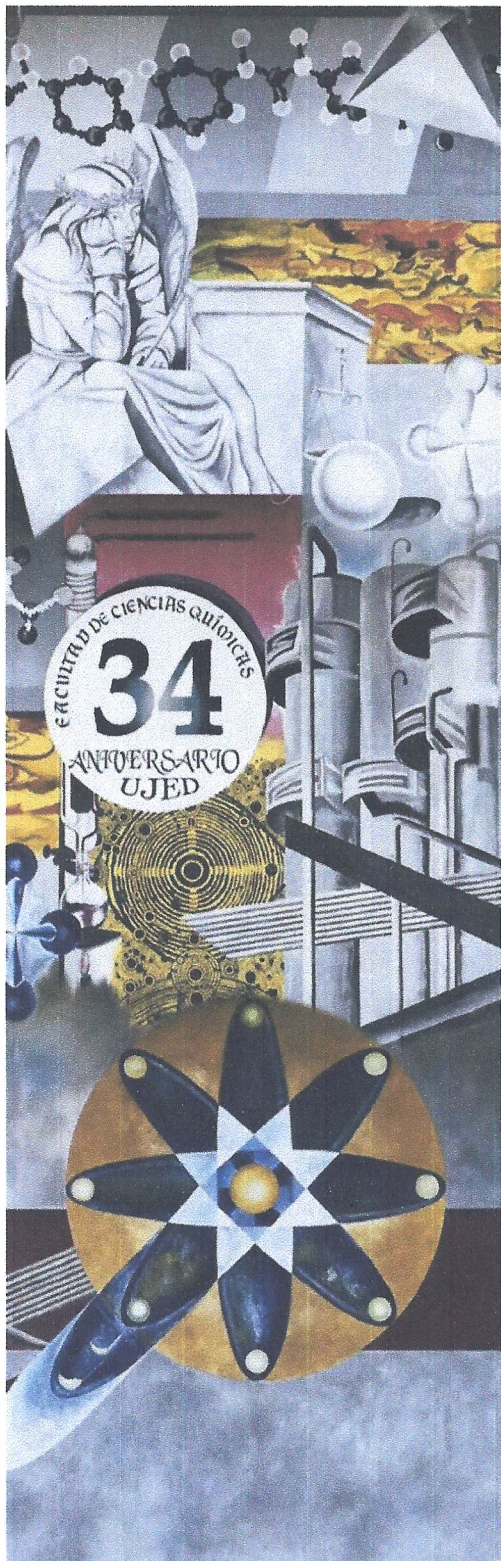
En el marco del XXXIV Aniversario de la Facultad de Ciencias Químicas  
del 24 al 28 de Septiembre de 2018



D.C. Eda Guadalupe Ramírez Valles  
Directora



D.C. Marcelo Barraza Salas  
Secretario Académico







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

# Constancia

A:

**González Delgado MF, Gonsebatt Bonaparte ME, Pérez Morales R.**

---

Por haber obtenido **PRIMER LUGAR** con el trabajo: "**Efectos de la intoxicación aguda con NaNO<sub>3</sub> a nivel hematológico, metabólico y tisular**"  
en la categoría: **INVESTIGACIÓN BÁSICA**  
en el XV Concurso de Trabajos de Investigación en Salud  
realizado en el marco 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





Volume 259S, 10 October 2016

ISSN 0378-4274  
259S S1–S248 (2016)

# Toxicology Letters



SOCIEDAD MEXICANA  
DE TOXICOLOGÍA AC  
somtox.com.mx



XIV International  
Congress of Toxicology

Merida, Mexico, October 2-6, 2016

XIV International Congress of Toxicology

# **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**

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. Gandarilla-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  $\text{N-NO}_3^-$  in drinking water. All volunteers had been living in Lerdo, Durango, Mexico for more than 1 year and shared similar dietary habits. Levels of  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  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  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  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, Tandogan, 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  caffeine. The mitochondrial metabolic activity was determined by MTT assay, while the cells were count 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>

## PP26.15

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



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

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

<sup>2</sup> FIQ-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* DH5 $\alpha$ , *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* DH5 $\alpha$  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.2016.07.590>

## 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. Luetlich<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. Vanscheeuwijk<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 (cM RTP).

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



RNS formation. Under a methemoglobinemia condition the cells must adapt to hypoxia and oxidative stress generated by the highly reactive metabolites, which induce to an adaptive response.

**Objective:** Analyze the effect of acute poisoning induced by nitrate and determine their effects at hematological and metabolic level.

**Materials and methods:** Male Wistar rats ( $n = 10$  per group) of 2–3 months old and weighing 100–150 g were administered for 10 days with 19, 66 and 150 mg/kg of  $\text{NaNO}_3$ . Methemoglobin percentage and levels of  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  in plasma and liver tissue were determined by spectrophotometry. Hematological and biochemical parameters were determined.

**Results:** Alterations caused by acute nitrate poisoning were found, as high percentages of methemoglobin (19% to 150 mg of  $\text{NaNO}_3$ ) and were positively correlated with the levels of  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  in plasma ( $r^2 = 0.92$ ,  $p = 0.01$ ). In the hematological parameters was increased the number of white cells ( $p = 0.0001$ ); while in biochemical parameters significant differences in glucose ( $p = 0.0001$ ) and triglycerides levels ( $p = 0.0001$ ) were found. Additionally, levels of AST, ALT and LDH were determined in plasma finding an increase in the activity at high exposure doses.

**Conclusions:** Nitrate poisoning induces alterations at hematological, metabolic and liver function level.

**Financial support:** This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT CB-2014-241713).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.724>

#### PP26.18

**Effects of Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on cell progression and expression of proteins of epithelial-mesenchymal transition: a possible effect on fibrosis?**



L. Rafael-Vázquez<sup>1</sup>, B. Bazan-Perkins<sup>2</sup>, D. Romero<sup>2</sup>, B. Quintanilla-Vega<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Toxicology Department, CINESTAV-IPN

<sup>2</sup> National Institute of Respiratory Diseases - INER, Mexico City, Mexico

**Introduction:** The di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is a widely used plasticizer. It is metabolized to mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), which is considered the main and most toxic metabolite. Inhalation is an important route of exposure of phthalates, however their effects on the lung function are not well known. The epithelial mesenchymal transition (EMT) is an important biological process that is classified in three types: type I (during development), type II (on fibrosis) and type III (on cancer progression and metastasis). The EMT is characterized by the loss of epithelial markers and appearance of mesenchymal markers.

**Objective:** To evaluate some epithelial and mesenchymal cell markers, cell progression and secretion of surfactant on A549 cells (human alveolar epithelial cells).

**Methods:** Progression of A549 cells was evaluated by the wound-healing assay with the co-treatment with mitomycin C (1.25 ng/ml) with different concentrations of DEHP (1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ ), and MEHP (1, 10 and 50  $\mu\text{M}$ ), and positive control cells incubated with the epidermal growth factor (EGF; 0.0125 ng/ml) at 24, 48 and 72 h. Epithelial and mesenchymal markers (e-cadherin, and  $\alpha$ -SMA), and the surfactant production (SP-B and SP-C) were evaluated by flow cytometry at 48 h in cells incubated with DEHP (1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ ), and MEHP (1, 10 and 50  $\mu\text{M}$ ), and transforming growth factor (TGF $\beta$ ; 5 ng/ml) as a positive control.

**Results:** An increase in cell progression was observed with DEHP (1, 10 and 100  $\mu\text{M}$ ) compared to control and MEHP-treated cells ( $p < 0.05$ ). A significant dose-dependent decrease in the number of positive cells to both surfactants (SP-B and SP-C) was observed with both phthalates (DEHP and MEHP). No difference was observed in the number of positive cells to  $\alpha$ -SMA, and preliminary results show a decrease number of cells positive to e-cadherin.

**Conclusions:** Our results suggest that both phthalates, DEHP and MEHP, have effects on the lung function, promoting the cell progression and decreasing markers of epithelial cells, and that they may have a role in fibrosis generation by promoting the EMT.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.725>

#### PP26.19

**Evaluation of the expression of GAS1 protein as an acute tubular damage marker in kidney tissue using a rat model exposed to gentamicin**



J. Narváez Morales<sup>1</sup>, D.A. Pérez Cortes<sup>2</sup>, J.L. Reyes<sup>3</sup>, J. Segovia Vila<sup>3</sup>, O. Barbier<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cinvestav-IPN, Department of Toxicology, México City, México

<sup>2</sup> University of Santander, Valledupar, Colombia

<sup>3</sup> Cinvestav-IPN, Department of Physiology and Biophysics Neuroscience, México City, México

**Introduction:** Even if serum creatinine and BUN have been used as markers for kidney damage in clinical routine during last decades, they are considered late markers and the finding of new early markers is the current challenge. GAS1 protein is expressed in brain, heart, lung, limbs, gonads and also kidney, where changes have been evidenced in the glomerulus mesangial cells during nephropathies; however, its presence in tubular parts of the nephron has not been studied.

**Objective:** As an attempt to identify new molecules as early biomarkers of acute kidney damage, we evaluate the expression of GAS1 in proximal and distal tubules in experimental rat models exposed to NaF (F50) or Gentamicin (GM), confirming the tissular damage using autophagic marker LC3B.

**Materials and methods:** 21 days old Wistar rats were orally exposed to F50 (50 ppm) for 40 days or subcutaneously inoculated with GM (10 mg/kg/day) for 7 days. A control group was also performed. At the end of the treatments, animals were sacrificed, kidneys were removed, sectioned histologically and dyed for immunofluorescence localization using confocal microscopy and semi-quantitation of GAS1 and LC3B by densitometry analysis.

**Results:** An increase of LC3B in proximal and distal tubules of rats exposed to F50 (subchronic kidney damage) with respect to control was observed indicating a raise in autophagy, in contrast with a decreased expression of GAS1.

In the model of rats exposed to GM (acute kidney injury), GAS1 and LC3B were both increased with respect to its control.






**Conclusion:** GAS1 protein was detected in both tubular structures of the nephron in 2 experimental models but the acute model was the only one to present an overexpression of this molecule. GAS1 protein could be a potential biomarker to evidence acute renal tubular damage but not to monitor the evolution of subchronic damage in kidney.

**Financial support:** CONACyT (grant 239689).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.726>

Article

# Biological and Proteolytic Variation in the Venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico

Miguel Borja <sup>1,2</sup> , Edgar Neri-Castro <sup>3</sup> , Gamaliel Castañeda-Gaytán <sup>1</sup>, Jason L. Strickland <sup>4</sup> , Christopher L. Parkinson <sup>5</sup> , Juan Castañeda-Gaytán <sup>1</sup>, Roberto Ponce-López <sup>3</sup>, Bruno Lomonte <sup>6</sup> , Alejandro Olvera-Rodríguez <sup>3</sup>, Alejandro Alagón <sup>3</sup> and Rebeca Pérez-Morales <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n. Fracc. Filadelfia, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico; alessandro\_53@hotmail.com (M.B.); gamaliel.cg@gmail.com (G.C.-G.); jjcg00@gmail.com (J.C.-G.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Artículo 123 s/n. Fracc. Filadelfia, Apartado Postal No. 51, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Mor., Mexico; neri@ibt.unam.mx (E.N.-C.); joserobertoponcelopez21@gmail.com (R.P.-L.); aolvera@ibt.unam.mx (A.O.-R.); alagon@ibt.unam.mx (A.A.)

<sup>4</sup> Department of Biology, University of Central Florida, 4000 Central Florida Blvd., Orlando, FL 32816, USA; Jason.Strickland@ucf.edu

<sup>5</sup> Department of Biological Sciences and Department of Forestry and Environmental Conservation, Clemson University, 190 Collings St., Clemson, SC 29634, USA; viper@clemson.edu

<sup>6</sup> Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José 11501, Costa Rica; bruno.lomonte@ucr.ac.cr

\* Correspondence: rebecapms@ujed.mx; Tel.: +52-871-7158810

Received: 20 November 2017; Accepted: 4 January 2018; Published: 8 January 2018

**Abstract:** Rattlesnake venoms may be classified according to the presence/absence and relative abundance of the neurotoxic phospholipases A<sub>2</sub>s (PLA<sub>2</sub>s), such as Mojave toxin, and snake venom metalloproteinases (SVMPs). In Mexico, studies to determine venom variation in Mojave Rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*) are limited and little is known about the biological and proteolytic activities in this species. Tissue (34) and venom (29) samples were obtained from *C. s. scutulatus* from different locations within their distribution in Mexico. Mojave toxin detection was carried out at the genomic (by PCR) and protein (by ELISA) levels for all tissue and venom samples. Biological activity was tested on representative venoms by measuring LD<sub>50</sub> and hemorrhagic activity. To determine the approximate amount of SVMPs, 15 venoms were separated by RP-HPLC and variation in protein profile and proteolytic activity was evaluated by SDS-PAGE ( $n = 28$ ) and Hide Powder Azure proteolytic analysis ( $n = 27$ ). Three types of venom were identified in Mexico which is comparable to the intraspecific venom diversity observed in the Sonoran Desert of Arizona, USA: Venom Type A (~Type II), with Mojave toxin, highly toxic, lacking hemorrhagic activity, and with scarce proteolytic activity; Type B (~Type I), without Mojave toxin, less toxic than Type A, highly hemorrhagic and proteolytic; and Type A + B, containing Mojave toxin, as toxic as venom Type A, variable in hemorrhagic activity and with intermediate proteolytic activity. We also detected a positive correlation between SVMP abundance and hemorrhagic and proteolytic activities. Although more sampling is necessary, our results suggest that venoms containing Mojave toxin and venom lacking this toxin are distributed in the northwest and southeast portions of the distribution in Mexico, respectively, while an intergradation in the middle of both zones is present.

**Keywords:** Mojave Rattlesnakes; Mojave toxin; PLA<sub>2</sub>s; SVMPs; venom phenotypes; hemorrhagic activity

**Key Contribution:** *Crotalus scutulatus scutulatus* individuals with Type A, Type A + B, and Type B venoms were confirmed in Mexico. Proteolytic and biological activity shows high variation among individuals with a specific geographic pattern.

---

## 1. Introduction

Venoms of snakes belonging to the Family Viperidae are comprised of a complex mixture of proteins that can be grouped into families based on their structural similarities [1]. The most common protein families in rattlesnake venoms are: Zn<sup>2+</sup> metalloproteinases, phospholipases A<sub>2</sub>s (PLA<sub>2</sub>s), serine proteinases, C-type lectins (CTLs), disintegrins, L-amino acid oxidase (LAAOs), cysteine rich secretory proteins (CRISPs), bradykinin potentiating peptides (BPPs), and myotoxins [2–7]. It has been proposed that rattlesnake venoms be classified into two groups according to their toxicity and proteolytic activity: Type I venoms are characterized by high proteolytic activity and moderate toxicity, while Type II venoms are more toxic but their proteolytic activity is lower or non-detectable [2]. The family responsible for most of the proteolytic activity in Type I venom is the snake venom metalloproteinase (SVMPs). In Type II venoms, the protein that is responsible for their high toxicity is a presynaptically acting  $\beta$ -neurotoxic PLA<sub>2</sub> called Mojave toxin (MTX) originally described in Mojave Rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*) but also found in *C. viridis*, *C. oreganus*, *C. mitchelli*, and *C. tigris* [8,9]. This toxin is homologous in structure to Crotoxin in *C. durissus* and *C. vegrandis*, and Canebrake toxin in *C. horridus* [8,10].

SVMPs are enzymes formed by multiple domains whose main toxic effects are due to the disruption of the hemostatic system. SVMPs are classified into three groups (P-I, P-II, and P-III) according to the number of domains they contain. P-I SVMPs are composed of only a metalloproteinase domain (M) while P-II SVMPs contain an additional disintegrin domain (D). P-III SVMPs are further divided into P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc and P-IIId based on post-translational modifications that these proteins can exhibit including presence of additional domains and domain hydrolysis and dimerization [11]. SVMPs induce several pathophysiological effects such as myonecrosis, blistering, inflammation, coagulopathy, and inhibition of platelet aggregation, but are most known for their capacity to generate local and systemic hemorrhage [12]. Bleeding has been associated with the ability of SVMPs to hydrolyze key components of basal membranes such as type IV, VI and XV collagens and perlecan [13]. Additionally, SVMPs are known for their proteolytic activity on other substrates such as Hide Powder Azure (HPA), casein, azocasein, and some proteins of the coagulation cascade including fibrin, fibrinogen, prothrombin, and factor X [14,15].

Mojave toxin, isolated for the first time from Mojave Rattlesnake venom, is a heterodimeric PLA<sub>2</sub> composed of one non-enzymatic acidic subunit (90 amino acids, 9.6 kDa, pI = 3.6) and one enzymatic basic subunit with PLA<sub>2</sub> activity (128 amino acids, 14.6 kDa, pI = 9.6) associated by non-covalent bonds [16]. Neurotoxic, cardiotoxic, and myonecrotic activities have been attributed to MTX and its toxicity has been calculated to be as low as 0.056 mg/kg i.v. via LD<sub>50</sub> tests in mice [16–19]. MTX is encoded by two genes composed of four exons and three introns each [20] and it is necessary that both MTX genes be expressed for the completely functional protein to be present in the venom [21]. MTX is structurally similar to other *Crotalus* neurotoxins such as Crotoxin (from the *C. durissus* complex). Both toxins share 96% and 99% of amino acid sequence identity for the acidic and basic subunits, respectively, and induce similar biological effects [22–24]. Previous reports have shown that antibodies against the basic subunit of Mojave toxin are able to react with the basic subunit of Crotoxin from *C. d. terrificus* venom, corroborating the high structural similarity between both proteins [25,26].

The dichotomy between toxicity and proteolytic activity can also be found within a single species of rattlesnake. In these cases, the phenotypes are referred to as Type A (neurotoxic and with scarce hemorrhagic and proteolytic activities—similar to Type II) and Type B (hemorrhagic and proteolytic and without neurotoxins—similar to Type I). Intra-specific variation in biochemical and biologic properties



of rattlesnake venoms has been broadly documented [27–30]. Particularly, geographic venom variation has been demonstrated in several rattlesnakes including Mojave Rattlesnakes (*C. scutulatus scutulatus*). Three venom phenotypes were originally described for populations of Mojave Rattlesnakes from the Sonoran Desert in the United States: Type A, Type B, and Type A + B (containing a combination of neurotoxic, hemorrhagic, and proteolytic activities) [31–33]. Massey et al. [5] extended this classification to six venom phenotypes (A, B, C, D, E, and F) varying from each other in the presence and abundance of three main proteins including Mojave toxin, SVMPs and myotoxin *a* (hereafter myotoxin). The first three phenotypes (A, B, and C) contain mostly SVMPs and very little if any Mojave toxin or myotoxin. The last three phenotypes (D, E, and F) are composed mostly for Mojave toxin and myotoxin with scarce or no SVMPs.

Mojave Rattlesnakes are distributed in the southwestern United States and Mexico [34]. In Mexico, the subspecies *C. s. scutulatus* can be found in the states of Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Jalisco, Nuevo León, Queretaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, and Zacatecas [34]. Although the composition of Mojave Rattlesnake venom in the United States has been broadly studied, in Mexico the only study of venom composition was carried out in La Comarca Lagunera, Mexico, a region located at the north-central portion of Mexico in the states of Coahuila and Durango. In this region, *C. s. scutulatus* displayed venom devoid of Mojave toxin and with biochemical and biological activities similar to Type B venom from the Sonoran Desert in the United States [35]. However, it has not been determined if Mojave rattlesnake individuals with neurotoxic (Type A) and/or neurotoxic and hemorrhagic (Type A + B) venom are present in Mexico nor whether Type B venom in Mexico and the U.S. are the same. Therefore, the goal of this study was to determine if the venom of Mojave Rattlesnakes in the southern portion of *C. s. scutulatus*' distribution is as diverse as it is in the U.S.A.

## 2. Results

### 2.1. Mojave Toxin Detection via PCR

Thirty-four *C. s. scutulatus* DNA samples from Mexico were tested for the presence of the genes of the two Mojave toxin subunits and compared to neurotoxic and non-neurotoxic *C. s. scutulatus* controls from Arizona. PCR amplification with both the acidic (MTXA) and basic (MTXB) primers generated fragments of ~1000 bp in 41% of the samples (Tables 1–3).

**Table 1.** Biologic and proteolytic activities of *C. s. scutulatus* with Type B venom from Mexico.

ID	Geographic Location	Genomic Mojave Toxin Presence (MTXA/MTXB)	% of MTX in Venom	% of SVMPs in Venom (RP-HPLC)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Hemorrhagic Activity (Intensity)	HPA Hydrolysis (U/mg)
CSS01	Aldama-Coyame, Chih.	No/No	0	ND	ND	3	42.4 ± 1.8
CSS02	Aldama-Coyame, Chih.	No/No	0	40	ND	4	39.3 ± 1.8
CSS03	Aldama-Coyame, Chih.	No/No	0	ND	ND	4	46.5 ± 10.7
CSS04	Aldama-Coyame, Chih.	No/No	0	ND	0.622	4	46.5 ± 3.1
CSS26	Aldama-Coyame, Chih.	No/No	0	40	0.842	3	31.9 ± 0.6
CSS27	Aldama-Coyame, Chih.	No/No	0	45	0.863	3	33.3 ± 2.4
CSS09	Matamoros, Coah.	No/No	0	ND	ND	4	42.4 ± 1.8
CSS12	Matamoros, Coah.	No/No	0	40	0.590	4	42.4 ± 1.8
CSS13	Matamoros, Coah.	No/No	0	ND	ND	ND	ND
CSS20	Matamoros, Coah.	No/No	0	ND	0.566	3	35.6 ± 1.9
CSS06	Tanque Aguilereño, Coah.	No/No	0	ND	ND	ND	35.5 ± 1.1
CSS17	Tanque Aguilereño, Coah.	No/No	0	ND	ND	ND	ND
CSS18	Tanque Aguilereño, Coah.	No/No	0	44	0.300	4	36.0 ± 0.3
CSS19	Tanque Aguilereño, Coah.	No/No	0	ND	0.584	3	32.1 ± 1.8
CSS29	Tanque Aguilereño, Coah.	No/No	0	ND	ND	4	37.2 ± 3.1
CSS05	Peñón Blanco, Durango	No/No	0	53	0.684	4	36.3 ± 0.6
CSS07	Mapimí, Durango	No/No	0	ND	ND	4	42.1 ± 4.2
CSS36	Plateros, Zacatecas	No/No	0	34	0.890	4	36.9 ± 0.9
ASU36103	Arizona, USA	No/No	0	34	1.090	3	34.9 ± 0.2

ND: not determined.



**Table 2.** Biologic and proteolytic activities of *C. s. scutulatus* with Type A venom from Mexico.

ID	Geographic Location	Genomic Mojave Toxin Presence (MTXA/MTXB)	% of MTX in Venom	% of SVMPs in Venom (RP-HPLC)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Hemorrhagic Activity (Intensity)	HPA Hydrolysis (U/mg)
CSS15	Tepezala, Ags.	Yes/Yes	18	15	0.152	0	4.0 ± 0.2
CSS16	Tepezala, Ags.	Yes/Yes	12	ND	0.102	0	5.0 ± 0.3
CSS21	Tepezala, Ags.	Yes/Yes	21.5	13	0.150	0	2.6 ± 0.3
CSS33	El Llano, Ags.	Yes/Yes	27.7	11	0.092	0	2.7 ± 0.3
CSS34	El Llano, Ags.	Yes/Yes	25.6	10	0.177	0	5.8 ± 0.2
CSS35	Rio San Pedro, Ags.	Yes/Yes	22.5	11	0.098	0	3.0 ± 0.4
CAS259916	Arizona, USA	Yes/Yes	37.9	1	0.130	0	5.7 ± 0.7

ND: not determined.

**Table 3.** Biologic and proteolytic activities of *C. s. scutulatus* with Type A + B venom from Mexico.

ID	Geographic Location	Genomic Mojave Toxin Presence (MTXA/MTXB)	% of MTX in Venom	% of SVMPs in Venom (RP-HPLC)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Hemorrhagic Activity (intensity)	HPA Hydrolysis (U/mg)
CSS22	Genaro García, Zacatecas	Yes/Yes	17	30	0.136	4	29.2 ± 2.5
CSS23	Ojuelos, Jalisco	Yes/Yes	29.5	ND	ND	2	25.5 ± 1.3
CSS24	Ojuelos, Jalisco	Yes/Yes	29	ND	ND	3	39.8 ± 1.3
CSS25	Ojuelos, Jalisco	Yes/Yes	21	23	0.203	2	21.8 ± 0.2
CSS30	La Asunción, Nuevo León	Yes/Yes	21.7	34	0.179	4	30.5 ± 2.3

ND: not determined.

In general, individuals containing acidic and basic subunits were found in the southeast portion of the sampling area, while snakes lacking Mojave toxin genes were distributed in the northwest region (Figure 1). Five samples (CSS08, CSS10, CSS11, CSS14 and CSS28, from Matamoros, Coahuila; San Tiburcio, Zacatecas; General Cepeda, Coahuila; Aguascalientes, Aguascalientes; and El Mezquite, Coahuila, respectively) were only analyzed for the presence of the Mojave toxin genes because they were collected dead on the road and no venom was available (Figure 1).

Therefore, these five samples were not included in Tables 1–3 because these assays were not possible. Samples CSS10, CSS11 and CSS14 were positive for both Mojave toxin genes. To corroborate that fragments obtained by PCR correspond to MTXA, the fragment obtained with the acidic subunit primers from individual CSS11 was sequenced and analyzed for similarities with other sequences on GenBank. Our sequence (GenBank Accession MG574869) is 99% percent similar to the acidic subunit of Mojave toxin from *C. s. scutulatus* from the United States (GenBank Accession KX211993 [36]).

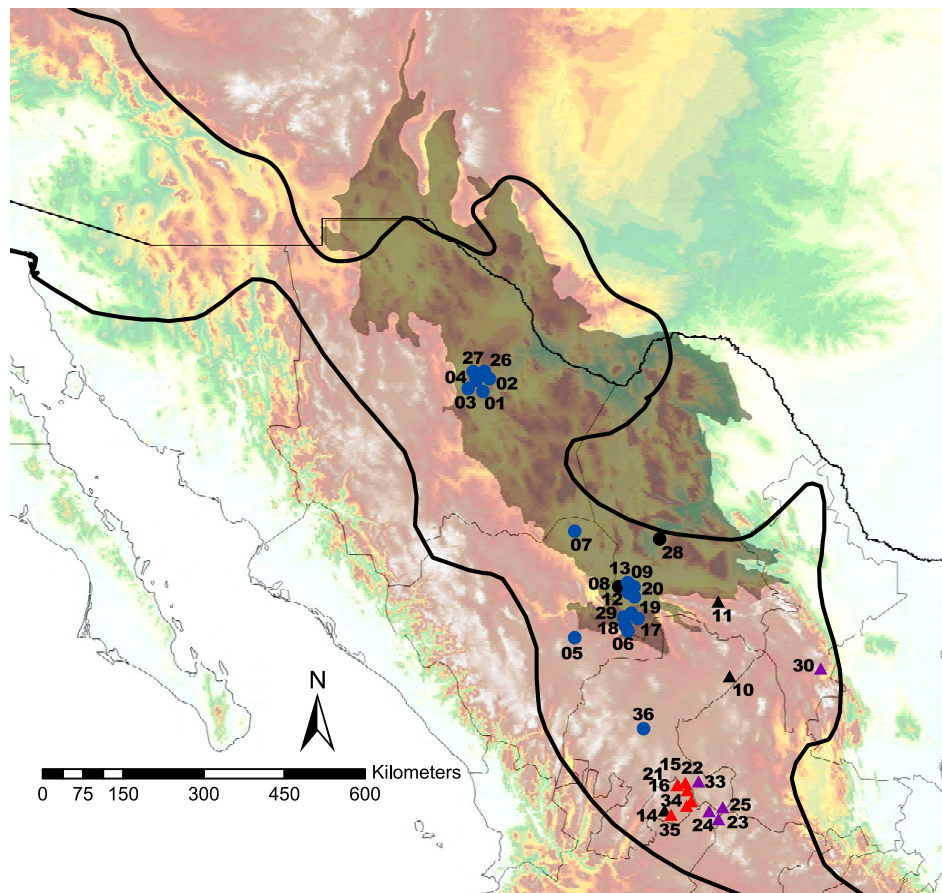
## 2.2. Mojave Toxin Detection by ELISA

Twenty-nine *C. s. scutulatus* venoms were tested for Mojave toxin using ELISA (Tables 1–3). Eleven venoms (38%) tested positive for Mojave toxin (Tables 2 and 3). All individuals containing Mojave toxin in their venom were positive for both Mojave toxin genes using PCR and no individuals containing Mojave toxin genes lacked the protein in their venom. The approximate amount of Mojave toxin in venoms calculated by ELISA was variable, ranging from 12% (CSS16) to 29.5% (CSS23) (Tables 2 and 3). The percentage of Mojave toxin in the Type A venom control from Arizona was 37.9%. As expected, the Type B venom control did not contain Mojave toxin.

## 2.3. Median Lethal Dose (LD<sub>50</sub>)

Eighteen venoms were analyzed for toxicity in mice (Tables 1–3). LD<sub>50</sub> values for Mexican neurotoxic venoms ranged from 0.092 mg/kg to 0.203 mg/kg with an average of 0.143 mg/kg (Tables 2 and 3). In addition, mice injected with these venoms displayed flaccid paralysis of the hind limbs, a neurotoxic effect. In contrast, venoms lacking Mojave toxin were less toxic with LD<sub>50</sub> values range from 0.300 mg/kg to 0.890 mg/kg with an average of 0.660 mg/kg (Table 1). Based on

this, venoms containing Mojave toxin were approximately five times more toxic than venoms lacking the neurotoxin. The controls from Arizona had LD<sub>50</sub> values of 0.13 mg/kg and 1.09 mg/kg for Type A and Type B venoms, respectively.



**Figure 1.** Geographic distribution of *C. s. scutulatus* individuals with and without Mojave toxin genes in Mexico. Individuals containing Mojave toxin are represented with triangles (red = Type A, purple = Type A + B, and black = collected dead), while individuals lacking Mojave toxin genes (Type B) are shown with circles (blue = venom assays conducted, black = collected dead). Numbers correspond to the individuals in Tables 1–3 without the C.S.S. abbreviation. The outline zone represents *C. s. scutulatus*' distribution, the shaded area represents the Chihuahuan Desert, and colors on the map represent elevation where light blue is closest to sea level and white is highest above sea level.

#### 2.4. Hemorrhagic Activity

Twenty-six venoms were tested for hemorrhagic activity (Tables 1–3). Fifteen venoms lacking Mojave toxin induced significant hemorrhagic activity (values of 3 and 4) and were classified as Type B (Table 1). Interestingly, five neurotoxic venoms also caused hemorrhaging although with variable intensity; these venoms were classified as Type A + B (Table 3). Venoms CSS23, CSS24, CSS25 from Ojuelos, Jalisco caused hemorrhage with values of 2, 3, and 2, respectively, while venoms from Genaro Garcia, Zacatecas (CSS22), and La Ascensión, Nuevo León (CSS30) had values of 4. Six neurotoxic venoms from Aguascalientes, and the neurotoxic control did not cause hemorrhaging and were classified as Type A (Table 2). The Type B venom from Arizona had a hemorrhage value of 3 (Table 1).

#### 2.5. Hide Powder Azure (HPA) Hydrolysis

Twenty-seven venoms were tested for HPA hydrolysis (Tables 1–3). Venoms displayed variable proteolytic activity to HPA. Venoms lacking Mojave toxin (Type B) were the most proteolytic

with values ranging from 31.9 to 46.5 U/mg (Table 1). Venoms with both Mojave toxin and hemorrhagic activity (Type A + B) hydrolyzed HPA in values ranging from 21.8 to 39.8 U/mg (Table 3). Finally, neurotoxic venoms without hemorrhagic activity (Type A) were less proteolytic than the first two groups of venoms with values of enzymatic activity from 2.6 to 5.8 U/mg (Table 2).

#### 2.6. Reverse Phase HPLC for MTX and SVMPs Detection

Fifteen representative venoms (Type A—CSS15, CSS21, CSS33, CSS34 and CSS35; Type B—CSS02, CSS05, CSS12, CSS18, CSS26, CSS27 and CSS36; and Type A + B—CSS22, CSS25 and CSS30) from Mexican *C. s. scutulatus* and both controls were fractionated by RP-HPLC (representative chromatograms are shown in Figure 2 and remaining in Figure A1).

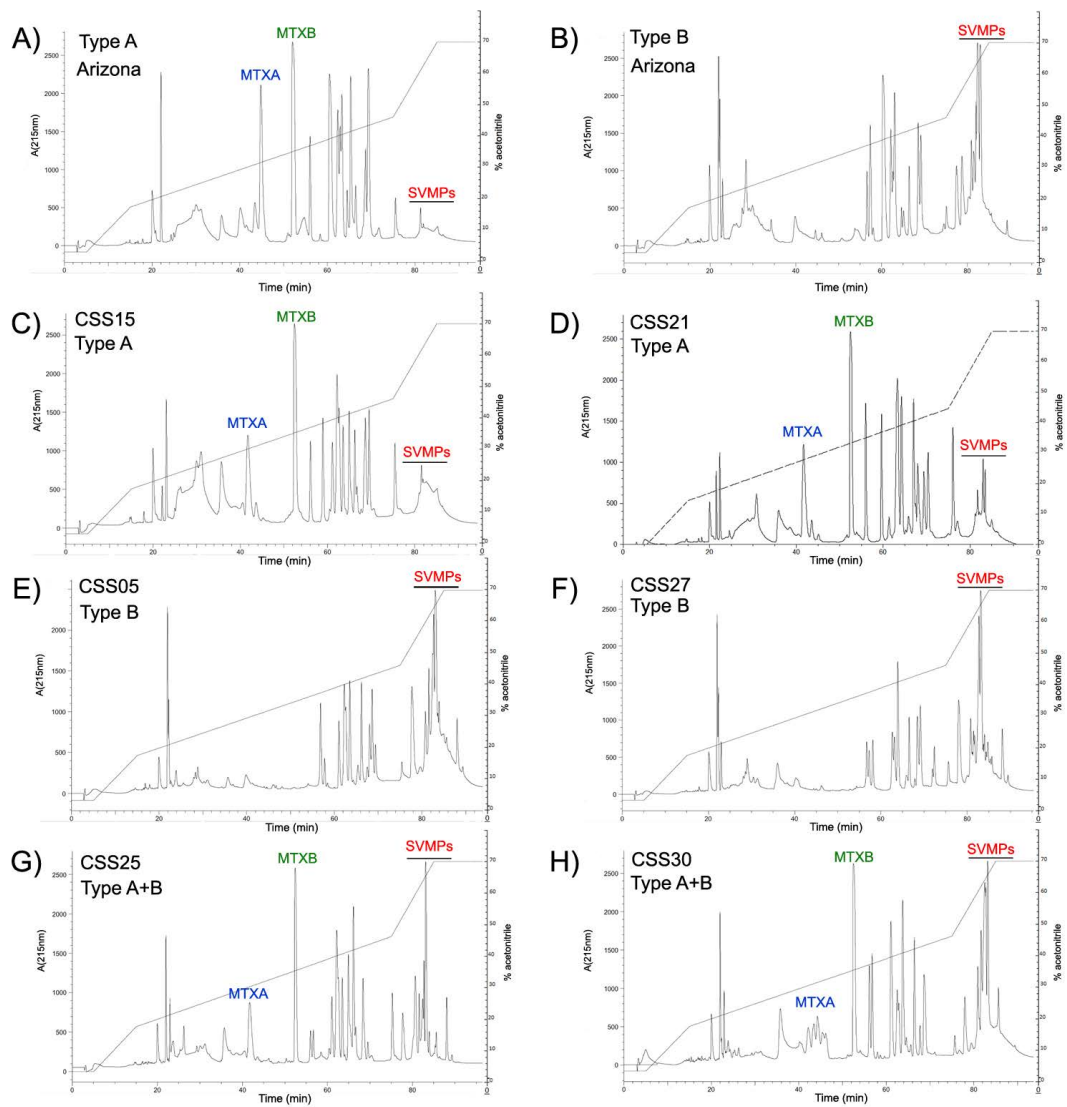
The fraction that eluted at 42 min was the acidic subunit of Mojave toxin based on our MALDI-TOF-TOF analysis which obtained the three chains that make up the subunit: (1) alpha chain: SSYGCYCYCGAGGAGGQGWPPQDASDRCCFEHDCCYAKLTGCDPTTTD; (2) beta chain: RQEDGEIVCGDDPCGTQQICECDKAAAIKFRDSMN; and (3) gamma chain: RFSPENCQGESQPC (Figure 2). This matched the sequence reported for the acidic subunit of Mojave toxin in the Uniprot database (P18998) [22]. A high peak eluting at approximately 52 min was detected in Type A and Type A + B venoms but was absent in Type B venoms (Figure 2). This peak corresponded to the basic subunit of Mojave toxin as demonstrated by N-terminal sequence analysis (HLLQFNKMIKFETR) and its molecular weight was 14.2 kDa and 14.3 kDa (by mass spectrometry), indicating the presence of at least two isoforms. The percentage of SVMPs in Type A, Type B, and Type A + B venoms was notably different (Tables 1–3 and Figure 2). Type A venom from Arizona and five venoms from Aguascalientes showed lower SVMPs abundance (1–15%) compared to the other eleven venoms analyzed. Conversely, the percentage of SVMPs in non-neurotoxic venoms ranged from 34–53%. Chromatograms of venoms containing neurotoxic and hemorrhagic activities revealed an intermediate SVMPs percentage with values from 23–34%. A significant positive correlation ( $r^2 = 0.865$ ;  $F = 84.4$ ;  $df = 1.13$ ;  $p < 0.001$ ) was observed between the SVMPs percentage and proteolytic activity (HPA hydrolysis) of Mexican *C. s. scutulatus* venoms, suggesting that as the amount of SVMPs increases, the proteolytic activity also increased (Figure 3).

#### 2.7. SVMPs Detection by Western Blot

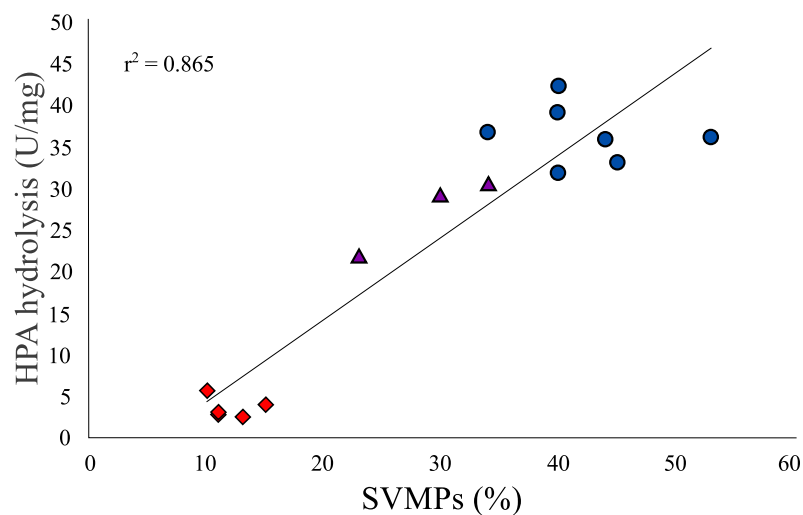
To confirm the fractions eluted after 78 min by RP-HPLC were SVMPs, a Western blot analysis was carried out. Figure 4A shows a SDS-PAGE with the venoms and fractions that were transferred to nitrocellulose membrane. Antibodies against SVMPs were unable to bind SVMPs in Type A venom (Figure 4B) or its fractions (data not shown).

Two antibody recognition zones (~24 kDa and ~62 kDa) were detected in whole Type B and CSS22 venoms and the reverse-phase HPLC fractions from the Type B venom. Unexpectedly, reverse-phase HPLC fractions from the CSS22 venom lacked the ~24 kDa band but displayed an additional band of ~55 kDa similar to the P-III SVMP used as positive control. No bands were seen in the lanes corresponding to Crotoxin and SVSPs which corroborates the antibody's specificity.

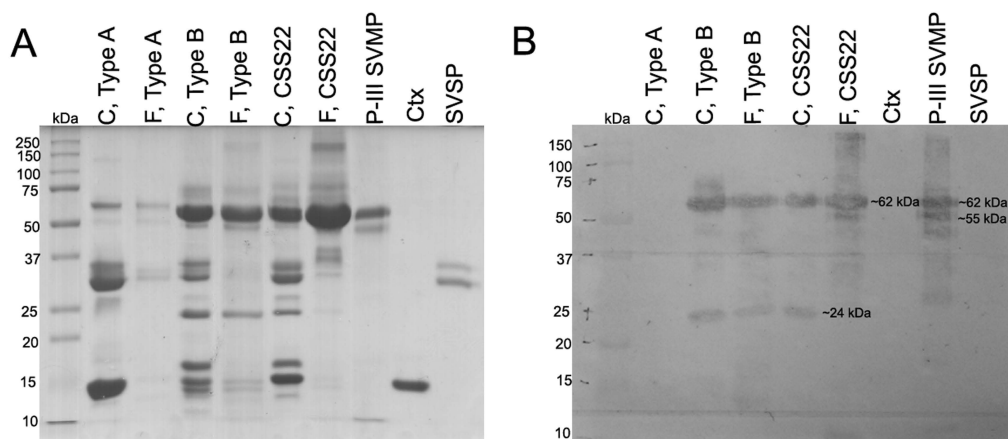




**Figure 2.** Representative reverse-phase HPLC chromatograms of the three *C. s. scutulatus* venom types found in Mexico. (A) Type A control venom from Arizona; (B) Type B control venom from Arizona; (C,D) Type A venoms from Mexico; (E,F) Type B venoms from Mexico; (G,H) Type A + B venoms from Mexico. Retention time is along the x axis for each panel and labeled every twenty minutes. Proteins were detected at 215 nm and absorbance is indicated on the left axis. The acetonitrile gradient is shown in the HPLC graph and the percentage value corresponds to the right axis for each panel. Acidic (MTXA) and basic (MTXB) subunits of Mojave toxin and snake venom metalloproteinases (SVMPs) are illustrated in blue, green and red, respectively. The remaining chromatograms are in Figure A1.



**Figure 3.** Relationship between the SVMP percentage and proteolytic activity (HPA hydrolysis) of venoms from fifteen *C. s. scutulatus* from Mexico. Type A, B and A + B venoms are red diamonds, blue circles, and purple triangles, respectively.



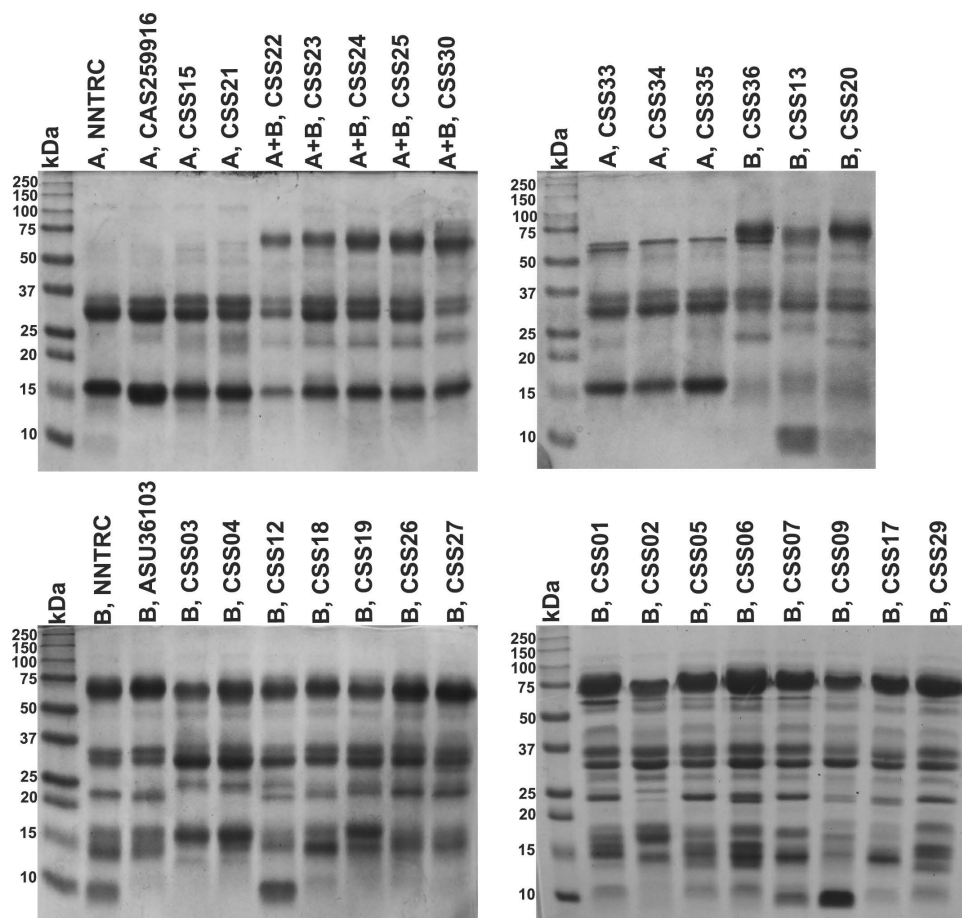
**Figure 4.** (A) SDS-PAGE; and (B) Western blot analysis for SVMPs detection of Type A and Type B venoms from Arizona as well as CSS22 venom from Mexico. Whole crude venoms are indicated with C and reverse-phase HPLC fractions eluted after 78 min are indicated with F. Ctx = Crotoxin; SVSP = snake venom serine protease; P-III SVMP = type III snake venom metalloproteinases.

## 2.8. SDS-PAGE

Twenty-eight *C. s. scutulatus* venoms from Mexico and four samples from the USA (two Type A and two Type B) were separated by SDS-PAGE. Notable differences were detected in the presence and intensity of several protein bands among the different venoms analyzed (Figure 5).

The most prominent differences were observed in the range of 50 to 75 kDa, where venoms displayed a prominent band of 62 kDa (likely PIII-SVMPs); however, this band was much less visible in the five Type A venoms from Aguascalientes (CSS15, CSS21, CSS33, CSS34, and CSS35). Inversely, venoms with faint 62 kDa band displayed an intense band of 15 kDa (likely the basic subunit of Mojave toxin). The zone near 15 kDa was more heterogeneous (in number and intensity of bands) in venoms lacking Mojave toxin but, in general, bands were less intense than those displayed by venoms with Mojave toxin. Interestingly, ten of the eighteen Type B Mexican venoms (CSS01, CSS05, CSS06, CSS07, CSS09, CSS12, CSS13, CSS17, CSS20, and CSS29) and the Type B control from NNTRC (National

Natural Toxins Research Center in Kingsville, Texas) had a small band of less than 10 kDa, which was absent in the rest of venoms and likely corresponds to myotoxins.



**Figure 5.** SDS-PAGE of *C. s. scutulatus* venoms from Mexico under reducing conditions. NNTRC A and B correspond to pooled Type A and Type B venoms from National Natural Toxins Research Center, respectively; A, CAS259916 and B, ASU36103 represent individual Type A and Type B venoms from Arizona, respectively. kDa: kilodaltons. Bands with molecular weight in the ranges of 75 to 50 kDa are likely SVMPs and ~15 kDa are likely PLA<sub>2</sub>s.

### 3. Discussion

We found Mojave toxin in 11 of 29 individuals of *C. s. scutulatus* from Mexico at both the genomic (PCR) and protein (ELISA) levels. Additionally, three samples from Mojave Rattlesnakes collected dead were also positive for Mojave toxin using PCR (CSS10, CSS11, and CSS14), although we could not confirm the presence of Mojave toxin in their venom because venom could not be collected. However, considering that in all other samples where Mojave toxin genes were amplified, the protein was observed in the venom, it is highly probable that these three individuals had Mojave toxin in their venom as well. We successfully determined the presence of Mojave toxin in *C. s. scutulatus* venoms from Mexico using monoclonal and polyclonal antibodies against Crotoxin. We did not find any individuals that were negative for Mojave toxin by PCR and positive by ELISA, indicating the specificity of the antibodies for neurotoxic PLA<sub>2</sub>s (Tables 1–3). These results corroborate the effectiveness of both techniques to detect Mojave toxin in *C. s. scutulatus* and are in agreement with other reports [21,37,38]. In addition, we confirmed the presence of Mojave toxin via RP-HPLC. Venoms that were positive for Mojave toxin in our ELISA analysis show two peaks at approximately 42 and



52 min in our chromatograms that were absent in venoms negative for Mojave toxin based on ELISA (Figure 2). We confirmed, via mass spectrometry and N-terminal sequencing analysis, that these two peaks correspond to the acidic and basic subunits of Mojave toxin, respectively. Using the same gradient, Castro et al. [27] detected the basic subunit of crotoxin at the same retention time in venoms of *C. simus* from Mexico. This indicates similar physicochemical characteristics between both neurotoxins.

We observed and characterized three types of venoms within *C. s. scutulatus* in Mexico according to their biological and biochemical activities and the presence/absence of Mojave toxin. First, Type A, containing Mojave toxin, was highly toxic, lacked hemorrhagic activity, and its proteolytic activity was minimal (Table 2). Second, Type A + B, expressed Mojave toxin, was as toxic as the Type A venom, was hemorrhagic, and its capacity to hydrolyze HPA was intermediate (Table 3). The third, Type B, did not contain Mojave toxin, its LD<sub>50</sub> was several times higher (i.e. less toxic) than the first two venom types, and was more hemorrhagic and proteolytic than the other two venom types (Table 1). This demonstrates conclusively that the three phenotypes are not just found in Arizona [39] and that venom variability of *C. s. scutulatus* in Mexico is just as diverse as it is in southern Arizona [5].

In other studies, it has been demonstrated that SVMPs are the proteins that elute last in RP-HPLC [5,27,40]. Similar to these reports, we detected important variation in the number and height of the peaks in the area after 78 min of elution in fifteen *C. s. scutulatus* venoms from Mexico (Figure 2). We confirmed via Western blot that this area contained SVMPs (Figure 4). Although only three venoms (Type A and Type B controls, and a venom Type A + B from Mexico) were tested for the presence of SVMPs by Western blot, it is clear that the amount of SVMPs in venom Type A is minimal or absent completely (no bands were detected by Western blot), while Type B and A + B venoms contained at least two groups of SVMPs according to their molecular mass: ~55 kDa and ~62 kDa likely P-III isoforms and ~24 kDa likely P-I SVMPs (Figure 4). These results were congruent with those observed in SDS-PAGE where venoms without hemorrhagic activity displayed thin bands in the zone of 50–75 kDa indicating minimal presence of P-III SVMPs (Figure 5). Our results also agree with those of Massey et al. [5] which reported that Mojave Rattlesnakes with Type B or Type A + B venom from Arizona contain two types of SVMPs: P-I (23 kDa) and P-III (48 kDa and 69 kDa), with the P-III being more abundant.

A positive correlation between the amount of SVMPs and proteolytic and hemorrhagic activities was noted (Figure 3). Venoms with the highest amount of SVMPs were the most proteolytic and hemorrhagic (Table 1). Inversely, venoms with a limited amount of SVMPs were least proteolytic and hemorrhagic. Dagda et al. [41] proposed for *C. s. scutulatus* that variation in hemorrhagic and proteolytic activities can be associated with structural differences in the metalloproteinase domain and/or differential metalloproteinase gene expression ligated to polymorphisms in the gene region that encode the metalloproteinase domain. In agreement with this hypothesis, variation in the proteolytic (gelatinase) activity related to SVMPs expression variation has been reported in the Eastern Diamondback Rattlesnake (*C. adamanteus*) indicating that differential gene expression can have an important influence in the venom's biological activities [42].

The variation in biological and biochemical activities in the venom of individual *C. s. scutulatus* specimens from Mexico reported here could have important implications in human envenomation presented in this country. In Mojave Rattlesnakes from the United States, neurotoxic venoms were approximately seven times more toxic in mice than the hemorrhagic ones [33]. Similarly, neurotoxic venoms from Mexico were about five times more lethal than venoms lacking Mojave toxin. The probability of intubation or death increases with the presence of neurotoxic components in venom [5]. Thus, despite the lack of clinical reports that would help to have a better correlation between venom types and clinical effects, more severe envenomation could be expected in areas of Mexico where Type A or Type A + B venoms are distributed. Moreover, regional variation in the number and relative abundance of the protein families in snake venoms has important implications in the antivenom effectiveness. Due to antivenoms being made with different venom immunization mixtures, only those proteins with similar structure to those used in the immunization mixture will

be recognized by the antivenom. Hence, if venoms in some areas are quite different to those used in the immunization of animals for the antivenom production, the capacity of antivenom to neutralize these particular toxins will be limited [43]. For example, the Mexican antivenom Antivipmyn had difficulties neutralizing neurotoxic venoms of *C. s. scutulatus* from Arizona and Texas and *C. s. salvini* from Mexico [44]. Therefore, knowledge of the areas in Mexico with variable venom is important to improve the selection of the venom mixture used to create Mexican antivenom.

Several hypotheses have been proposed to explain geographic venom variation in rattlesnakes. These hypotheses include rattlesnake hybridization [21,30], prey size (the bigger the prey, more metalloproteinases required to digest), geographic latitude and/or altitude (if the environmental thermal conditions are quite variable such as extremes of latitude and/or altitude, more metalloproteinases are required to degrade tissues) [2], and prey stability in the habitat (places where a substantial recent shift in prey has occurred, Mojave toxin is retained as result of strong selection for high toxicity) [45]. In Mexico, *C. s. scutulatus* are predominately distributed in two physiographic regions: uplands and lowlands of the North and the Central Mesa. The uplands and lowlands of the North are relatively flat and located in three states, Chihuahua, Coahuila, and Durango, with an arid/semiarid climate and an annual amount of precipitation varying from 125 to 400 mm. The average altitude is approximately 1000 m.a.s.l. The vegetation in this area is comprised primarily of desert microphyllous matorral and desert rosetophyllous matorral [46]. On the other hand, the Central Mesa includes portions of the states of Zacatecas, San Luis Potosi, Guanajuato, Durango, Jalisco, Aguascalientes, and Queretaro. The minimum elevation in the Central Mesa province is 1180 m.a.s.l, while the highest point is 3200 m.a.s.l. The climate in this area is semiarid; however, differences in elevation results in sharp contrast between close localities in their climatic conditions. The precipitation ranges from 300 mm to 900 mm. The vegetation consists of rosetophyllous matorrals and matorral with cacti and natural grasslands. An interesting feature of the climate in this area is its inverted zonality: the temperatures decrease and precipitation increases from north to south [46]. Individuals with venom Type A and Type A + B were found mainly in the Central Mesa (a higher and cooler place), while individuals with venom Type B were located mostly in the uplands and lowlands of the North (lands with low altitudes and higher temperatures, Figure 1). The only exception was the individual CSS36 from Plateros, Zacatecas who lacked Mojave toxin despite having been found at higher elevation comparing to the other Type B venoms. A similar pattern was observed in *Crotalus oreganus helleri* venom where geographic venom variation was related to altitude differences, so, individuals living in the higher altitude and greatest temperature fluctuations had Type A venom lacking SVMPs almost entirely [29]. Although more sampling is needed, it is possible that climatic differences in the subregions (that might represent different evolutionary environmental pressures) are, in part, associated with the venom variation seen in the *C. s. scutulatus* from Mexico. This hypothesis would need to be tested in conjunction with environmental data. In addition, other studies have hypothesized that transition between lowland Chihuahuan desert habitat and higher elevation semi-arid habitat in the Central Mesa could have formed a biogeographic barrier for some species [47,48]. Finally, considering that Mojave Rattlesnakes with venom Type A + B were found in an area located in the middle between individuals with venom B (located further north) and A (located further south), an intergrade zone is likely, similar to the one described in Arizona [32].

#### 4. Conclusions

In conclusion, *C. s. scutulatus* individuals with Type A, Type A + B, and Type B venoms are distributed in Mexico. Individuals with Type B venom seem to be distributed in the northwest region and individuals with Type A and A + B venoms are found in the southeast region. Additionally, we found an interesting tendency in which individuals containing Mojave toxin were generally detected in areas with higher elevation compared to Type B venoms, however, this same tendency has not been noted in *C. s. scutulatus* individuals from the United States. In this manner, more sampling is needed to completely delimit the areas where *C. s. scutulatus* with venoms A, B, and A + B

are distributed in Mexico and to test the hypothesis that altitude is an important environmental factor influencing the venom variation in the Mojave rattlesnake.

As previously reported, venoms lacking Mojave toxin were more hemorrhagic and proteolytic than venoms containing the neurotoxin and this difference is possibly associated to variations in the amount of SVMPs present in the venoms. Mexican Mojave Rattlesnakes with Type A and Type B venom were similar in biological (toxicity and hemorrhagic activity) and biochemical (proteolytic activity and protein profile) properties to those from Arizona used as controls and published studies of *C. s. scutulatus* in the U.S.

## 5. Materials and Methods

### 5.1. Ethics Statement

We followed the guidelines described by the live animal use committees of the Facultad de Ciencias Biológicas at UJED, the Universidad Nacional Autónoma de México, and the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) of Mexico as well as developing our protocols in accordance with the American Society of Ichthyologists and Herpetologists guidelines for use of live amphibians and reptiles. Animal care and use protocols involving snakes in the USA were approved by UCF's Institutional Animal Care and Use Committee under protocol 13-17W. SEMARNAT issued collecting permits (SGPA/DGVS/01090/17 and 03562/15) for samples collected in Mexico and the controls from the U.S. were collected under State of Arizona Game and Fish Department (SP628489, SP673390, SP673626, SP715023).

### 5.2. *Crotalus scutulatus scutulatus* Sampling

Blood and venom samples were obtained from twenty-nine *C. s. scutulatus* from different areas of Mexico. Additionally, five tissue samples of dead individuals were collected from animals that were hit by cars. Venom and blood from two Mojave Rattlesnakes with Type A and Type B venom from Arizona were used as controls. To reduce the number of mice sacrificed in this study and to conserve venom (snakes were milked once and a variable amount of venom was obtained from each snake), venom analyses were prioritized based on importance and amount of venom available for subsequent analyses.

### 5.3. PCR Detection of Mojave Toxin Genes

Genomic DNA was extracted from blood or tissue using the DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instruction. Detection of portions of the MTXA (F 5'-TGCGGGGAGAAGTGGTATTT-3'; R 5'-GCAATTTTCGGGCGAGAACC-3') and MTXB (F 5'-ACCTGCTGCAATTCAACAAGA-3'; R 5'-CGAGAGTCCGGGTAAAACAT-3') genes was carried out by PCR using the primers designed by Zancolli et al. [21]. The PCR mix was made as follows: DNA (100–300 ng), primers (0.2  $\mu$ M), Go Taq<sup>®</sup> DNA polymerase

(Promega, Fitchburg, WI, USA, 0.5 units), dNTP mix (0.1 mM), and MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), in a total volume of 10  $\mu$ L. PCR was conducted starting with a heat denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of heat denaturation at 90 °C for 30 s, annealing for 60 s, and extension at 72 °C for 1.5 min, and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR annealing temperatures for MTXA and MTXB were 61 °C and 62.8 °C, respectively. Fragments were visualized with Gel Red in a 1% agarose gel after electrophoresis. Additionally, the PCR product generated with the primers for acidic subunit from individual CSS11 was further purified and sequenced at the Massive DNA Sequence Unit, Instituto de Biotecnología, UNAM to corroborate that the fragment amplified corresponded to MTXA.



#### 5.4. Protein Concentration Determination

The protein concentration in the venoms was determined in triplicate using the Pierce® Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) using bovine serum albumin (BSA) as a standard, according to the manufacturer's instruction. All analyses that used venom used this to control for the protein concentration.

#### 5.5. Mojave Toxin Detection by Sandwich ELISA

ELISA plates (Nunc MaxiSorp) were sensitized for 1 h at 37 °C with 100 µL per well of the monoclonal antibody 4F6 against the basic subunit of Crotoxin to a final concentration of 5 µg/mL in sensitization solution (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.5). Then, plates were washed twice with 200 µL of wash solution (50 mM Tris/HCl, pH 8 + 150 mM NaCl + 0.05% Tween 20); this step was repeated after every ELISA step. Plates were blocked with blocking buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8 + 0.5% gelatin + 0.2% Tween 20) for 2 h at 37 °C. A standard curve with purified basic subunit of Crotoxin was prepared to 2 µg/mL by making serial dilutions (1:3). In addition, 150 µL of serial dilutions (1:3) of each venom (20 µg/mL) was added per well and incubated for 1 h at 37 °C. One hundred microliters of rabbit polyclonal antibodies against Crotoxin (1 µg/mL) were added per well and incubated 1 h at 37 °C. Rabbit anti-IgG antibodies conjugated to horseradish peroxidase (HRP) diluted 1:4000 were added and incubated for 1 h at 37 °C. Finally, plates were revealed by adding 100 µL of revealing buffer (containing 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). Absorbance was read at 405 nm using a spectrophotometer (Magellan®).

#### 5.6. Median Lethal Dose (LD<sub>50</sub>)

LD<sub>50</sub> analysis was carried out as described in Borja et al. [35]. Freeze-dried venoms were redissolved in phosphate buffer solution (PBS), pH 7.2. The lethal dose was determined by injecting different quantities of venom diluted in a total volume of 0.5 mL into the caudal vein of male and female ICR-CD1 mice (18 to 20 g) in groups of three. The percentage of dead mice 24 h after inoculation was plotted against the logarithm of the quantity of venom injected and analyzed with nonparametric methods using the program GraphPad Prism V4.0b.

#### 5.7. Hemorrhagic Activity

Hemorrhagic activity was assessed using a modification of the technique described by Dagda et al. [41]. Briefly, 15 µg of each venom dissolved in a total volume of 50 µL PBS was injected subcutaneously in the shaved backs of five mice including both males and females from the ICR-CD1 strain (from 28–30 g). After 3 h, the mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> inhalation and the dorsal skin was removed and extended over a glass plate. Afterward, the halo of hemorrhage produced by each venom was measured to obtain the average hemorrhagic halo generated. Hemorrhagic activity is reported on a relative scale from 0 to 4, where 4 indicates high hemorrhagic activity (hemorrhagic are greater than 20 mm in diameter) and 0 indicates no hemorrhagic activity [41].

#### 5.8. Hide Powder Azure (HPA) Hydrolysis

Hydrolysis of hide powder azure was determined by adding 100 µg of venom to 1 mL of a solution containing 5 mg of HPA in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0. After 2 h of incubation, the reaction was stopped by centrifugation at 14,000 rpm for 5 min. Optical absorbance of the supernatant was determined at 595 nm. Each sample was tested in triplicate. A standard curve of HPA hydrolysis was done adding 50 µL of trypsin (2 mg/mL) to three concentrations of HPA (2, 4 and 6 mg/mL). Venom enzymatic activity was calculated using the standard curve. A unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of venom necessary to digest 1 mg of HPA in a 2 h period at room temperature and reported as specific activity (U/mg) [49].

### 5.9. Reverse Phase HPLC for MTX and SVMPs Detection

Venom proteins were separated by reverse phase HPLC on an analytic C18 reverse-phase column (Vydac<sup>®</sup>, Deerfield, IL, USA, 218 TP 4.6 mm × 250 mm) using an Agilent 1100 chromatograph. In brief, each venom (1 mg) was dissolved in 1.7 mL of water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Elution was performed as described by Neri-Castro et al. [27] at 1 mL/min by applying a gradient toward solution B (acetonitrile, containing 0.1% TFA), as follows: 0% B for 5 min, 0 to 15% B over 10 min, 15 to 45% B over 60 min, 45 to 70% B over 10 min, and 70% B for 9 min. Proteins were detected at 215 nm. For one sample (CSS33), we collected and dried the fractions that eluted at approximately 42 and 52 min and for another sample (CSS22) we collected and dried the effluent collected after 78 min. The fraction that eluted at 42 min likely corresponds to the acidic subunit of Mojave toxin. To verify this, the protein sequence was obtained by tandem mass spectrometry of peptides after digestion of the DTT-reduced and iodoacetamide-alkylated protein with trypsin and analyzed by MALDI-TOF-TOF mass spectrometry on a Proteomic Analyzer 4800-Plus instrument (Applied Biosystems) at the Instituto Clodomiro Picado in Costa Rica. The fraction eluted at 52 min was analyzed by Mass Spectrometry (LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer) and N-terminal sequence analysis (PPSQ-31A Protein Sequencer) to verify MTXB presence and fractions eluted after 78 min were used in Western blot analysis using antibodies against SVMPs to verify SVMP presence. The relative abundance (% of the total venom proteins) of SVMPs in seventeen venoms (including controls) was calculated based on the relation of the sum of the areas of the reverse-phase chromatographic peaks eluted after 78 min, which is the time SVMPs begin to elute [27]. Relationship between the SVMPs percentage in venoms and proteolytic activity (HPA hydrolysis) was analyzed using linear regression. Significant was determined at the level of  $p < 0.05$ .

### 5.10. SVMP Detection by Western Blot

Reverse-phase HPLC fractions eluted after 78 min and whole crude Type A, Type B and CSS22 (as Type A + B Mexican venom control) venoms (15 µg) were separated using SDS-PAGE under reducing conditions (in the presence of β-mercaptoethanol). After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using a model HEP-1 semi-dry immunotransference chamber (Thermo Scientific). After transference at 400 mA for 1 h, the membrane was blocked with 5% non-fat dry milk diluted in TBST buffer (0.01 M Tris-HCl + 0.15M NaCl + 0.05% of Tween-20, pH 7.5) for 2 h. The membrane was then rinsed three times with TBST and incubated by shaking gently for 1 h at ~28 °C (room temperature) with rabbit antibodies against P-III SVMPs from *C. simus* in a concentration of 1 µg/mL diluted in 10 mL TBST. After three washes with TBST, the membrane was incubated at room temperature for 1 h with goat antibodies anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (Thermo Scientific). The membrane was again rinsed with TBST and then developed by adding 1-Step Ultra TMB substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Purified P-III SVMPs, SVSPs, and Crotoxin were used as controls.

### 5.11. SDS-PAGE

The discontinuous system was used on a Miniprotean III system (BioRad). Venom samples (15 µg) were dissolved in sample buffer (50 mM Tris- HCl, pH 6.8, 25% SDS, 10% glycerol, and 0.002% bromo- phenol blue), in the presence of 5% β-mercaptoethanol. Samples were boiled for 5 min and run on a 15% acrylamide gel. Gels were stained with 0.2% Coomassie brilliant blue R-250, 10% acetic acid, and 25% methanol for 1 h and rinsed in 10% acetic acid and 10% methanol [35]. Standard molecular mass markers (Bio-Rad) were used as references. To compare electrophoretic profile between pooled and individual Type A and Type B venoms from the United States, an additional set of pooled Type A and Type B venoms from The National Natural Toxins Research Center were separated by SDS-PAGE too.

**Acknowledgments:** We would like to thank Melisa Bernard, Flavio C. García, Cristobal Moreno, Alan Salas, Fernando Hernandez, Manuel Rodriguez, Sara Valenzuela, Bruno Rodriguez, Leonardo Badillo, Jesus Sigala, Ricardo Ramirez, Raul Solis, Ivan Villalobos, Gustavo Quintero, Gustavo Zavala, Ivan Ahumada, Erick Rivas, Arely Gutierrez, Jason Jones, Chris Grünwald, Hector Franz, Esau Flores, Eduardo Fanti, and Andrew Mason for their help in the field and laboratory. We thank Fernando Zamudio for his help with determining the masses of and doing the N-terminal sequencing for MTXB. We thank Jorge Espinoza and Claudia Avitia for making suggestions that improved this manuscript. For funding, we would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONACYT) for supporting with project 221343 and the scholarship grant to the postgraduate student M.B. (No. 247437), the U.S. National Science Foundation to CLP (DUE 1161228) which funded J.L.S., and the Howard McCarley Student Research Award of the Southwestern Association of Naturalist (M.B. and J.L.S.). We thank the Universidad Juarez del Estado de Durango for provided facilities and vehicles.

**Author Contributions:** M.B., E.N.-C. and A.A. conceived and designed the experiments; M.B., G.C.-G., J.C.-G., J.L.S. and C.L.P. carried out field work and sampling; M.B., E.N.-C., R.P.-L., A.O.-R. performed the experiments; M.B., E.N.-C., G.C.-G., J.L.S., J.C.-G., A.A., B.L. and R.P.-M. analyzed the data. R.P.-M., A.A., G.C.-G., C.L.P., B.L. and A.O.-R. contributed reagents, materials, analysis tools and/or funding; M.B., E.N.-C., G.C.-G., J.L.S., A.A. and R.P.-M. wrote the paper; all authors edited and approved the final submission.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

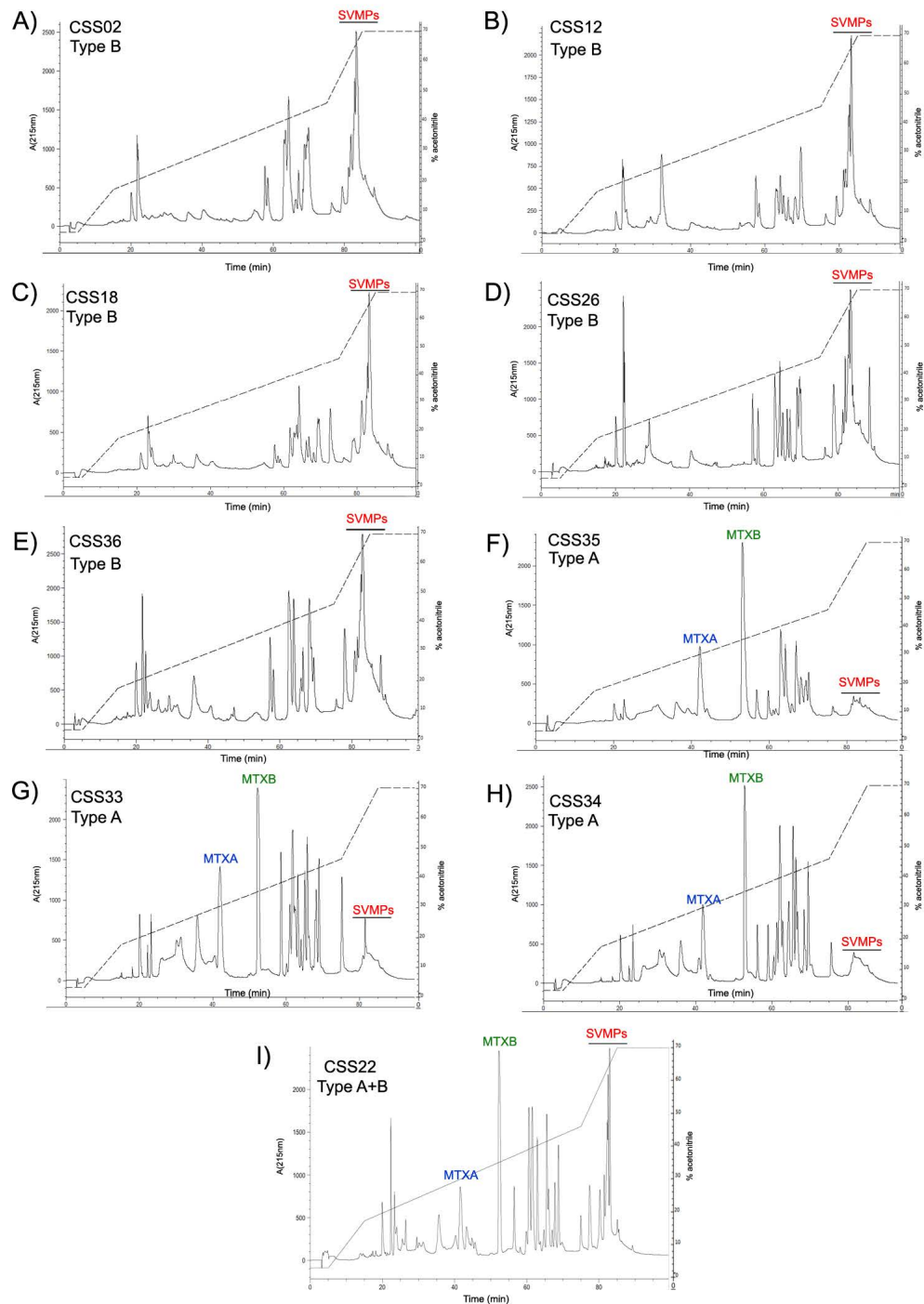
## Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

Ags.	Aguascalientes
Chih.	Chihuahua
Coah.	Coahuila
CSS	<i>Crotalus scutulatus scutulatus</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HPA	Hide Powder Azure
LD <sub>50</sub>	Median Lethal Dose 50
MDPI	Multidisciplinary Digital Publishing Institute
MTX	Mojave toxin
MTXA	Acidic subunit of Mojave toxin
MTXB	Basic subunit of Mojave toxin
ND	No determined due to lack of venom available
NNTRC	National Natural Toxins Research Center
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
RP-HPLC	Reverse-Phased High Performance Liquid Chromatography
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SVMP	Snake Venom Metalloproteinases
SVSP	Snake Venom Serine Protease
UCF	University of Central Florida
UJED	Universidad Juárez del Estado de Durango
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México



## Appendix A. RP-HPLC Chromatograms



**Figure A1.** Reverse-phase HPLC chromatograms not shown in Figure 2 of the three *C. s. scutulatus* venom types found in Mexico: (A–E) Type B venoms from Mexico; (F–H) Type A venoms from Mexico; and (I) Type A + B venom from Mexico. Retention time is along the x axis for each panel and labeled every twenty minutes. Proteins were detected at 215 nm and absorbance is indicated on the left axis. The acetonitrile gradient is shown in the HPLC graph and the percentage value corresponds to the right axis for each panel. Acidic (MTXA) and basic (MTXB) subunits of Mojave toxin and snake venom metalloproteinases (SVMPs) are illustrated in blue, green and red, respectively.

## References

1. Kang, T.S.; Georgieva, D.; Genov, N.; Murakami, M.T.; Sinha, M.; Kumar, R.P.; Kaur, P.; Kumar, S.; Dey, S.; Sharma, S.; et al. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* **2011**, *278*, 4544–4576.
2. Mackessy, S.P. Venom composition in rattlesnakes: Trends and biological significance. In *The Biology of Rattlesnakes*; Hayes, W.K., Beaman, K.R., Cardwell, M.D., Bush, S.P., Eds.; Loma Linda University Press: Loma Linda, CA, USA, 2008; pp. 495–510.
3. Calvete, J.J.; Fasoli, E.; Sanz, L.; Boschetti, E.; Righetti, P.G. Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomomics and combinatorial peptide ligand library approaches. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3055–3067.
4. Boldrini-França, J.; Corrêa-Netto, C.; Silva, M.M.; Rodrigues, R.S.; De La Torre, P.; Pérez, A.; Soares, A.M.; Zingali, R.B.; Nogueira, R.A.; Rodrigues, V.M.; et al. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: Assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. *J. Proteom.* **2010**, *73*, 1758–1776.
5. Massey, D.J.; Calvete, J.J.; Sánchez, E.E.; Sanz, L.; Richards, K.; Curtis, R.; Boesen, K. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 2576–2587.
6. Tasoulis, T.; Isbister, G.K. A review and database of snake venom proteomes. *Toxins* **2017**, *9*, 290, doi:10.3390/toxins9090290.
7. Calvete, J.J.; Sanz, L.; Cid, P.; de la Torre, P.; Flores-Díaz, M.; Dos Santos, M.C.; Borges, A.; Bremo, A.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; et al. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 528–544.
8. Doley, R.; Kini, R.M. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 2851–2871.
9. Calvete, J.J.; Pérez, A.; Lomonte, B.; Sánchez, E.E.; Sanz, L. Snake venomomics of *Crotalus tigris*: The minimalist toxin arsenal of the deadliest nearctic rattlesnake venom. Evolutionary clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 1382–1390.
10. Ho, C.; Lee, C. Presynaptic actions of Mojave toxin isolated from Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom. *Toxicon* **1981**, *19*, 889–892.
11. Takeda, S.; Takeya, H.; Iwanaga, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 164–176.
12. Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A.; Escalante, T. Snake venom metalloproteinases: Biological roles and participation in the pathophysiology of envenomation. In *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*; Mackessy, S.P., Ed.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2010; pp. 115–138.
13. Escalante, T.; Rucavado, A.; Fox, J.W.; Gutiérrez, J.M.; Rica, C. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J. Proteom.* **2011**, *74*, 1781–1794.
14. Ramos, O.; Selistre-de Araujo, H. Snake venom metalloproteinases—Structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *142*, 328–346.
15. Fox, J.W.; Serrano, S.M. Snake venom metalloproteinases. In *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*; Mackessy, S.P., Ed.; CRC Press/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2010; pp. 95–113.
16. Cate, R.L.; Bieber, A.L. Purification and characterization of mojave (*Crotalus scutulatus scutulatus*) toxin and its subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* **1978**, *189*, 397–408.
17. Bieber, A.L.; Tu, T.; Tu, A.T. Studies of an acidic cardiotoxin isolated from the venom of mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus*). *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *400*, 178–188.
18. Gopalakrishnakone, P.; Hawgood, B.J.; Holbrooke, S.E.; Marsh, N.A.; Santana De Sa, S.; Tu, A.T. Sites of action of Mojave toxin isolated from the venom of the Mojave rattlesnake. *Br. J. Pharmacol.* **1980**, *69*, 421–431.
19. Valdes, J.J.; Thompson, R.G.; Wolff, V.L.; Menking, D.E.; Rael, E.D.; Chambers, J.P. Inhibition of calcium channel dihydropyridine receptor binding by purified Mojave toxin. *Neurotoxicol. Teratol.* **1989**, *11*, 129–133.
20. John, T.R.; Smith, L.A.; Kaiser, I.I. Genomic sequences encoding the acidic and basic subunits of Mojave toxin: Unusually high sequence identity of non-coding regions. *Gene* **1994**, *139*, 229–234.

21. Zancolli, G.; Baker, T.; Barlow, A.; Bradley, R.; Calvete, J.; Carter, K.; de Jager, K.; Owens, J.; Price, J.; Sanz, L.; et al. Is hybridization a source of adaptive venom Variation in rattlesnakes? A test, using a *Crotalus scutulatus* x *viridis* hybrid zone in southwestern New Mexico. *Toxins* **2016**, *8*, 188, doi:10.3390/toxins8060188.
22. Bieber, A.L.; Becker, R.R.; McParland, R.; Hunt, D.F.; Shabanowitz, J.; Yates, J.R.; Martino, P.A.; Johnson, G.R. The complete sequence of the acidic subunit from Mojave toxin determined by Edman degradation and mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, *1037*, 413–421.
23. Bouchier, C.; Ducancel, F.; Guignery-Frelat, G.; Bon, C.; Boulain, J.C.; Ménez, A. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the two subunits of Crotoxin. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9050, doi:10.1093/nar/16.18.9050.
24. Aird, S.D.; Kruggel, W.G.; Kaiser, I.I. Amino acid sequence of the basic subunit of Mojave toxin from the venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus s. scutulatus*). *Toxicon* **1990**, *28*, 669–673.
25. Henderson, J.T.; Bieber, A.L. Antigenic relationships between Mojave toxin subunits, Mojave toxin and some crotalid venoms. *Toxicon* **1986**, *24*, 473–479.
26. Rael, E.D.; Salo, R.J.; Zepeda, H. Monoclonal antibodies to Mojave toxin and use for isolation of cross-reacting proteins in *Crotalus* venoms. *Toxicon* **1986**, *24*, 661–668.
27. Neri-Castro, E.; Lomonte, B.; del Carmen Gutiérrez, M.; Alagón, A.; Gutiérrez, J.M. Intraspecies variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *J. Proteom.* **2013**, *87*, 103–121.
28. Borja, M.; Lazcano, D.; Martínez-Romero, G.; Morlett, J.; Sánchez, E.; Cepeda-Nieto, A.C.; Garza-García, Y.; Zugasti-Cruz, A. Intra-specific variation in the protein composition and proteolytic activity of venom of *Crotalus lepidus morulus* from the northeast of Mexico. *Copeia* **2013**, *2013*, 707–716.
29. Sunagar, K.; Undheim, E.A.B.; Scheib, H.; Gren, E.C.K.; Cochran, C.; Person, C.E.; Koludarov, I.; Kelln, W.; Hayes, W.K.; King, G.F.; et al. Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): Biodiscovery, clinical and evolutionary implications. *J. Proteom.* **2014**, *99*, 68–83.
30. Rokyta, D.R.; Wray, K.P.; McGivern, J.J.; Margres, M.J. The transcriptomic and proteomic basis for the evolution of a novel venom phenotype within the Timber Rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Toxicon* **2015**, *98*, 34–48.
31. Glenn, J.J.L.; Straight, R.C.; Wolfe, M.M.C.; Hardy, D.D.L. Geographical variation in *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) venom properties. *Toxicon* **1983**, *21*, 119–130.
32. Glenn, J.L.; Straight, R.C. Intergradation of two different venom populations of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Toxicon* **1989**, *27*, 411–418.
33. Sánchez, E.E.; Galán, J.A.; Powell, R.L.; Reyes, S.R.; Soto, J.G.; Russell, W.K.; Russell, D.H.; Pérez, J.C. Disintegrin, hemorrhagic, and proteolytic activities of Mohave rattlesnake, *Crotalus scutulatus scutulatus* venoms lacking Mojave toxin. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *141*, 124–132.
34. Campbell, J.A.; Lamar, W.W. *The venomous reptiles of the Western Hemisphere*; Comstock Publishing Associates: Ithaca, NY, USA, 2004; p. 870.
35. Borja, M.; Castañeda, G.; Espinosa, J.; Neri, E.; Carbajal, A.; Clement, H.; García, O.; Alagon, A. Mojave Rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) with type B venom from Mexico. *Copeia* **2014**, *2014*, 7–13.
36. Dowell, N.L.; Giorgianni, M.W.; Kassner, V.A.; Selegue, J.E.; Sanchez, E.E.; Carroll, S.B. The deep origin and recent loss of venom toxin genes in rattlesnakes. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 2434–2445.
37. Wooldridge, B.; Pineda, G.; Banuelas-Ornelas, J.; Dagda, R.; Gasanov, S.; Rael, E.; Lieb, C. Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*) lacking the acidic subunit DNA sequence lack Mojave toxin in their venom. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *130*, 169–179.
38. Powell, R.L.; Lieb, C.S.; Rael, E.D. Geographic distribution of Mojave toxin and Mojave toxin subunits among selected *Crotalus* species. In *The Biology of Rattlesnakes*; Hayes, W.K., Beaman, K.R., Cardwell, M.D., Bush, S.P., Eds.; Loma Linda University Press: Loma Linda, CA, USA, 2008; pp. 537–550.
39. Wilkinson, J.A.; Glenn, J.L.; Straight, R.C.; Sites, J.W. Distribution and genetic variation in venom A and B populations of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) in Arizona. *Herpetologica* **1991**, *47*, 54–68.
40. Durban, J.; Pérez, A.; Sanz, L.; Gómez, A.; Bonilla, F.; Rodríguez, S.; Chacón, D.; Sasa, M.; Angulo, Y.; Gutiérrez, J.M.; et al. Integrated “omics” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 234, doi:10.1186/1471-2164-14-234.








41. Dagda, R.K.; Gasanov, S.E.; De La OIII, Y.; Rael, E.D.; Lieb, C.S. Genetic basis for variation in metalloproteinase-associated biochemical activity in venom of the Mojave Rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Biochem. Res. Int.* **2013**, doi:10.1155/2013/251474.
42. Margres, M.J.; Walls, R.; Suntravat, M.; Lucena, S.; Sánchez, E.E.; Rokyta, D.R.; Sanchez, E.E. Functional characterizations of venom phenotypes in the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for expression-driven divergence in toxic activities among populations. *Toxicon* **2016**, *119*, 28–38.
43. Gutiérrez, J.M.; León, G.; Burnouf, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. *Biologicals* **2011**, *39*, 129–142.
44. Dobson, J.; Yang, D.; op den Brouw, B.; Cochran, C.; Huynh, T.; Kurrupu, S.; Sánchez, E.E.; Massey, D.J.; Baumann, K.; Jackson, T.N.; et al. Rattling the border wall: Pathophysiological implications of functional and proteomic venom variation between Mexican and US subspecies of the desert rattlesnake *Crotalus scutulatus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2017**, doi:10.1016/j.cbpc.2017.10.008.
45. Powell, R.L.; Lieb, C.S. Perspectives on venom evolution in *Crotalus*. In *The Biology of Rattlesnakes*; Hayes, W.K., Beaman, K.R., Cardwell, M.D., Bush, S.P., Eds.; Loma Linda University Press: Loma Linda, CA, USA, 2008; pp. 551–556.
46. Krasilnikov, P.; Gutiérrez-Castorena, M.d.C.; Ahrens, R.J.; Cruz-Gaistardo, C.O.; Sedov, S.; Solleiro-Rebolledo, E. *The Soils of Mexico*; World Soils Book Series; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2013.
47. Marshall, C.J.; Lieberr, J.K. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *J. Biogeogr.* **2000**, *27*, 203–216.
48. Bryson, R.W.; García-Vázquez, U.O.; Riddle, B.R. Phylogeography of Middle American gophersnakes: Mixed responses to biogeographical barriers across the Mexican Transition Zone. *J. Biogeogr.* **2011**, *38*, 1570–1584.
49. Rinderknecht, H.; Geokas, M.; Silverman, P.; Haverback, B. A new ultrasensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clin. Chim. Acta* **1968**, *21*, 197–203.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Article

# Ontogenetic Change in the Venom of Mexican Black-Tailed Rattlesnakes (*Crotalus molossus nigrescens*)

Miguel Borja <sup>1,2</sup>, Edgar Neri-Castro <sup>3,4</sup>, Rebeca Pérez-Morales <sup>2</sup>, Jason L. Strickland <sup>5</sup>, Roberto Ponce-López <sup>3</sup>, Christopher L. Parkinson <sup>5,6</sup>, Jorge Espinosa-Fematt <sup>7</sup>, Jorge Sáenz-Mata <sup>1</sup>, Esau Flores-Martínez <sup>1</sup>, Alejandro Alagón <sup>3</sup> and Gamaliel Castañeda-Gaytán <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Universidad s/n. Fracc. Filadelfia, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico; alessandro\_53@hotmail.com (M.B.); jsaenz\_mata@ujed.mx (J.S.-M.); pollomtz97@hotmail.com (E.F.-M.)

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av. Artículo 123 s/n. Fracc. Filadelfia, Apartado Postal No. 51, C.P. 35010 Gómez Palacio, Dgo., Mexico; rebecapms@ujed.mx

<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001, Chamilpa, C.P. 62210 Cuernavaca, Mor., Mexico; neri@ibt.unam.mx (E.N.-C.); joseroberponcelopez21@gmail.com (R.P.-L.); alagon@ibt.unam.mx (A.A.)

<sup>4</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas UNAM, C.P. 04510 México D.F., Mexico

<sup>5</sup> Department of Biological Sciences, Clemson University, 190 Collings St., Clemson, SC 29634, USA; jlstreck@clemson.edu (J.L.S.); viper@clemson.edu (C.L.P.)

<sup>6</sup> Department of Forestry and Environmental Conservation, Clemson University, 190 Collings St., Clemson, SC 29634, USA

<sup>7</sup> Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez del Estado de Durango, Calz. Palmas 1, Revolución, 35050 Gómez Palacio, Dgo., Mexico; dr.jorge.espinosa@gmail.com

\* Correspondence: gamaliel.cg@gmail.com; Tel.: +52-871-715-2077

Received: 31 October 2018; Accepted: 26 November 2018; Published: 1 December 2018



**Abstract:** Ontogenetic changes in venom composition have important ecological implications due the relevance of venom in prey acquisition and defense. Additionally, intraspecific venom variation has direct medical consequences for the treatment of snakebite. However, ontogenetic changes are not well documented in most species. The Mexican Black-tailed Rattlesnake (*Crotalus molossus nigrescens*) is large-bodied and broadly distributed in Mexico. To document venom variation and test for ontogenetic changes in venom composition, we obtained venom samples from twenty-seven *C. m. nigrescens* with different total body lengths (TBL) from eight states in Mexico. The primary components in the venom were detected by reverse-phase HPLC, western blot, and mass spectrometry. In addition, we evaluated the biochemical (proteolytic, coagulant and fibrinogenolytic activities) and biological (LD<sub>50</sub> and hemorrhagic activity) activities of the venoms. Finally, we tested for recognition and neutralization of Mexican antivenoms against venoms of juvenile and adult snakes. We detected clear ontogenetic venom variation in *C. m. nigrescens*. Venoms from younger snakes contained more crotamine-like myotoxins and snake venom serine proteinases than venoms from older snakes; however, an increase of snake venom metalloproteinases was detected in venoms of larger snakes. Venoms from juvenile snakes were, in general, more toxic and procoagulant than venoms from adults; however, adult venoms were more proteolytic. Most of the venoms analyzed were hemorrhagic. Importantly, Mexican antivenoms had difficulties recognizing low molecular mass proteins (<12 kDa) of venoms from both juvenile and adult snakes. The antivenoms did not neutralize the crotamine effect caused by the venom of juveniles. Thus, we suggest that Mexican antivenoms would have difficulty neutralizing some human envenomations and, therefore, it may be necessary improve the immunization mixture in Mexican antivenoms to account for low molecular mass proteins, like myotoxins.

**Keywords:** antivenom; crotamine-like myotoxins; life history; phenotypic variability; sexual maturity; snake venom metalloproteinases; snake venom serine proteinases

**Key Contribution:** Clear ontogenetic venom variation was detected in *C. m. nigrescens* where venoms from juvenile snakes were, in general, more toxic and procoagulant but less proteolytic. Additionally, Mexican antivenoms were not effective at recognizing and neutralizing low molecular mass proteins, such as mycotoxins, predominantly found in juvenile venoms.

---

## 1. Introduction

Phenotypic variation as a result of ontogenetic changes during the life of an organism result from differential selection pressures through time [1]. Because of the different pressures, the realized niche also differs through time based on size and maturity. Differences can include the utilization of different habitats [2], risk to predation [3], and diet breadth [2,4,5]. For example, many species of snakes are known to change the prey composition of their diet based on their size [6–9]. The change in diet is possibly due to the increase in gape size through time [10]. For venomous snakes, there is evidence that many species undergo ontogenetic changes in venom composition that likely accompany the changes in diet [11–14]. The switch in phenotype tends to be associated with size at sexual maturity when the animals become capable of reproduction. For example, Margres et al. [15] reported that ontogenetic shift in venom composition of *C. adamanteus* occurred at 102 cm, the size at which the species reaches sexual maturity. Phenotypic changes through time have relevant ecological implications for the species as well as medical implications. Understanding ontogenetic venom variation is important from medical and biotechnological perspective because these phenotypic differences have direct consequences for the treatment of snake bites.

In general, more toxic and procoagulant venoms have been detected in newborn or juvenile snakes compared to adults [16–22]. These ontogenetic differences in biological activities of venoms could be reflected in different clinical manifestations in people bitten by newborn, juvenile or adult snakes. Differences in venom composition during different life-stages may cause antivenoms that are effective against adult venoms to be ineffective against the venom of juveniles [17,23]. Disentangling phenotypic differences due to ontogeny is challenging because many venom phenotypes, such as rattlesnakes, also have a high level of intraspecific and interspecific variability. Some rattlesnake species display different phenotype of venom (e.g., neurotoxic and hemorrhagic) though their distribution, where more severe envenomations may be expected in areas where rattlesnakes with neurotoxic venoms are distributed [24,25]. But, even when the differences are not as diverse as neurotoxic and hemorrhagic, there is still high levels of variability across the geographic distribution of many species [14,21,26].

Rattlesnake (Viperidae: *Crotalus* and *Sistrurus*) venoms are complex cocktails of proteins containing from 30 to over 100 toxins [27] with key ecological functions for prey acquisition and defense [28]. These proteins are grouped into families according to their sequence similarity, activity and structure [29]. The number and proportion of these protein families in snake venoms can vary at inter and intra-specific levels. Generally, the most abundant venom components in rattlesnakes are myotoxins (Myo), phospholipase A<sub>2</sub>s (PLA<sub>2</sub>s), snake venom metalloproteinases (SVMPs), and snake venom serine proteinases (SVSPs) [30]. Intraspecifically, venom variation has been observed in individuals from different geographic regions [31–35], age [13,14,19,21,36,37] and less commonly sex [38,39]. Snake venom variation may be mediated by genetic polymorphisms [40,41], presence/absence of genes that code for specific toxins (e.g., PLA<sub>2</sub>s and SVMPs) [42,43], and/or post-translational modifications [44,45]. Additionally, age-related venom variation has been associated more frequently to differences in the expression of some specific toxin families [15].



There are approximately 50 species of rattlesnakes which are only found in the New World. Mexico contains the highest number of rattlesnake species with 43 (42 *Crotalus* and 1 *Sistrurus*; Data taken from [www.reptiledatabase.org](http://www.reptiledatabase.org)). Recent studies have demonstrated important intraspecific venom variation in several rattlesnake species distributed in Mexico including: *Crotalus morulus* [46], *C. culminatus*, *C. simus*, *C. tzabcan* [47], *C. s. scutulatus* [33,48] and *C. polystictus* [21]. Additionally, in several species of rattlesnakes, ontogenetic changes have been documented that correspond with different toxin families. In species such as *C. culminatus* and *C. tzabcan*, a reduction in the amount of myotoxins in venoms as snakes increase their size has been detected [49], but in other species, the opposite occurs [50]. Additionally, SVMPs have been shown to increase as species such as *C. oreganus helleri*, *C. o. oreganus*, *Crotalus polystictus* and *C. simus* get larger [19,21,23,49]. However, even in relatively abundant and widely distributed rattlesnake species, there is little information on the composition of their venoms and the implications of possible ontogenetic venom variation in public health or in the efficacy of antivenoms.

The Black-tailed Rattlesnake (*Crotalus molossus*) is a large bodied species that reaches adult size at approximately 57.6 and 65.3 cm snout-vent length (SVLs), for males and females, respectively [51] Due to the large size differences from neonate (total body length (TBL): ~30 cm) to adult (up to 152.4 cm TBL) [52,53], this species would likely undergo changes in diet composition through time which may be accompanied by venom differences. Balderas-Valdivia et al. [54] reported that *C. m. nigrescens* adults from La Reserva Ecologica del Pedregal in Mexico City feed predominately on rodents, while younger snakes consume predominately lizards. A similar pattern was reported by Werler and Dixon [55] for the closely related Eastern Black-tailed Rattlesnake, *C. ornatus*, from Texas, which shifts from lizards to rodents as they transition from juveniles to adults.

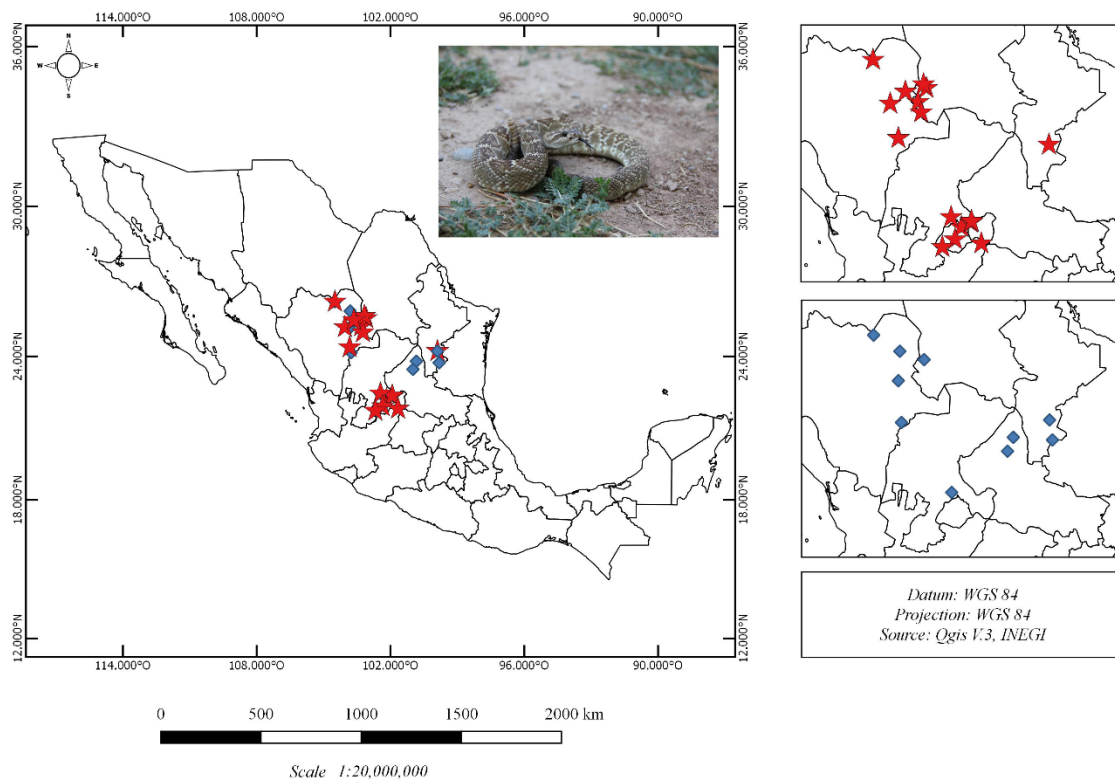
The Mexican Black-tailed Rattlesnake (*Crotalus molossus nigrescens*) is one of four subspecies within *C. molossus* (the other three are *C. m. estebanensis*, *C. m. molossus* and *C. m. oaxacus*) and has the largest distribution in Mexico. Its distribution extends from Northern Durango, Southern Chihuahua and Northern Nuevo León south to Western Veracruz and Northern Oaxaca [53]. Despite the fact that this subspecies is broadly distributed in Mexico, little is known about the biochemical and biological activities of its venom. Previous research reported that *C. m. nigrescens* venom is rich in hydrolytic enzymes such as thrombin-like proteases (21.4 kDa) and proteinase E (75 kDa) [56] and it can have myotoxins  $\alpha$  (crotamine-like) [57]. Additionally, ontogenetic venom variation in fibrinolytic and complement inactivation activities was detected in the Northern Black-tailed Rattlesnake (*C. m. molossus*) [58] so it is possible this change also occurs in *C. m. nigrescens*. Although there is no information available about human envenomations by *C. m. nigrescens*, it has been reported that *C. m. molossus* bites induce edema, ecchymosis, coagulopathy, thrombocytopenia, swelling, and hemorrhagic blebs [59,60]. Additionally, compartment syndrome was reported for one patient bitten by this subspecies [61].

Here, we use range-wide sampling of *C. m. nigrescens* to assess venom variability to test for ontogenetic changes in the biochemical and biologic activities of the venom. We were able to collect a range of sizes for this species and place the variability in a geographic context. This study represents the most complete characterization of the biochemical and biological properties of this subspecies and will be of help for future analyses on related subspecies and species.

## 2. Results

### 2.1. *Crotalus Molossus Nigrescens* Samples

Venom samples were obtained from twenty-seven *C. m. nigrescens* from eight states in Mexico (Figure 1; Table 1). Sixteen snakes were male, nine were females, and two were unknown (CM10 and CM28). The total body length (TBL) of the snakes ranged from 37 to 105 cm (Table 1), but could not be recorded for three individuals (CM21, CM26 and CM28). These three individuals were medium to large adults.



**Figure 1.** Geographic distribution of the twenty-seven *C. m. nigrescens* samples analyzed in this study. Snakes with a total body length (TBL) less than and greater than 70 cm are represented with blue diamonds and red stars, respectively.

**Table 1.** Biologic and biochemical properties of *C. m. nigrescens* venoms from Mexico sorted by total body length (TBL) from smallest to largest.

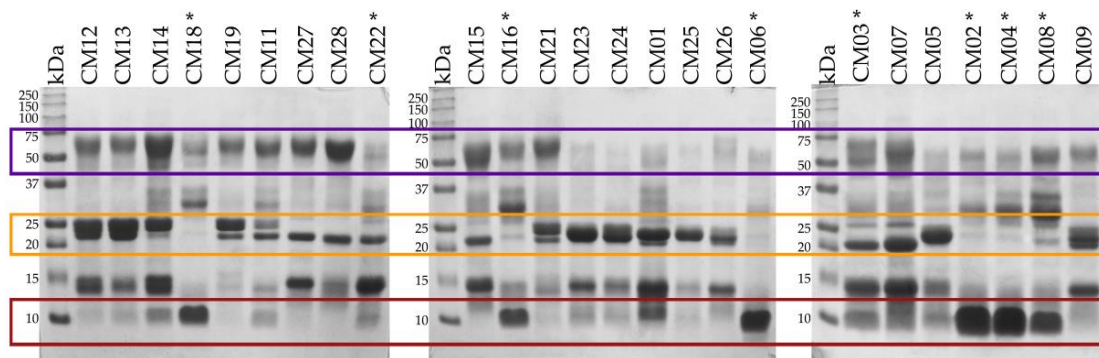
ID	Sex	TBL (cm)	Locality	% of Crotamine-Like Myotoxins in Venom	% of SVMPs in Venom	% of SVSPs in Venom	HPA Hydrolysis (U/mg)	Azocasein Hydrolysis (U/mg)	MCD-P ( $\mu\text{g}$ of Venom)	Fibrinogenolytic Activity
CM16	F	37	La Ascensión, N. L.	9.7	41.1	25.1	2.2 $\pm$ 0.04	0.31 $\pm$ 0.02	13.5	$\alpha$
CM08	M	40	Ignacio López Rayón, Dgo.	15.3	31.8	38.0	14.0 $\pm$ 0.3	1.35 $\pm$ 0.01	10.3	$\alpha$
CM18	F	47.5	Genaro Codina, Zac.	30.0	33.6	22.9	7.0 $\pm$ 0.3	0.32 $\pm$ 0.01	14.7	$\alpha$
CM10	ND	49.5	Real de Catorce, S. L. P.	31.8	26.0	24.6	11.1 $\pm$ 0.1	ND	24.5	ND
CM04	F	60	Mapimí, Dgo.	48.6	14.0	18.7	7.0 $\pm$ 0.7	0.94 $\pm$ 0.08	416	$\alpha$
CM02	M	64	Pedriceña, Dgo.	52.7	18.1	12.5	3.6 $\pm$ 0.08	1.4 $\pm$ 0.06	36	$\alpha$
CM03	F	67	Matamoros, Coah.	8.8	44.6	15.8	12.8 $\pm$ 0.6	3.8 $\pm$ 0.13	390	$\alpha$
CM17	M	67	Guadalupe del Carnicero, S. L. P.	6.0	41.5	25.4	50.5 $\pm$ 2.9	3.2 $\pm$ 0.01	301	$\alpha$ and $\beta$
CM22	F	68	Miquihuana, Tam.	2.2	35.6	29.5	9.6 $\pm$ 0.08	1.9 $\pm$ 0.06	44	ND
CM06	F	69	Agua Puerca, Dgo.	41.2	21.9	14.0	19.4 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 0.03	151	$\alpha$
CM24	M	70	Matamoros, Coah.	1.8	57.32	6.22	178.3 $\pm$ 4.0	8.4 $\pm$ 0.27	>400 *	$\alpha$ and $\beta$
CM11	M	72	Tepezalá, Ags.	6.5	47.1	20.4	136.5 $\pm$ 4.2	4.2 $\pm$ 0.18	43.3	$\alpha$ and $\beta$
CM14	M	72	Genaro García, Zac.	4.5	61.3	14.5	152.7 $\pm$ 2.5	3.6 $\pm$ 0.19	271 *	$\alpha$ and $\beta$
CM05	M	72.5	Nazas, Dgo.	0	59.5	12.3	174.7 $\pm$ 2.6	7.5 $\pm$ 0.27	75	$\alpha$ and $\beta$
CM19	F	75	Genaro Codina, Zac.	3.2	56.5	11.5	163.8 $\pm$ 11.0	6.3 $\pm$ 0.16	>400	$\alpha$ and $\beta$
CM25	F	78.5	Agua Puerca, Dgo.	4.4	51.6	13.2	142.3 $\pm$ 4.3	7.7 $\pm$ 0.25	182	$\alpha$ and $\beta$
CM07	M	80	Barreal de Guadalupe, Coah.	4.3	49.3	13.2	24.9 $\pm$ 1.8	3.8 $\pm$ 0.15	350	$\alpha$
CM15	M	80.5	La Ascensión, N. L.	0	50.1	21.6	68.0 $\pm$ 1.33	3.9 $\pm$ 0.01	470	$\alpha$ and $\beta$
CM12	M	82	Genaro García, Zac.	0	67.5	12.4	183.3 $\pm$ 6.5	6.0 $\pm$ 0.05	0 <sup>†</sup>	$\alpha$ and $\beta$
CM13	M	93	Genaro García, Zac.	0	67.7	5.1	203.8 $\pm$ 3.2	7.2 $\pm$ 0.21	0 <sup>†</sup>	$\alpha$ and $\beta$
CM27	F	102	Milpillas de Arriba, Ags.	0	44.8	14.8	99.8 $\pm$ 7.4	3.4 $\pm$ 0.20	33.5	$\alpha$
CM01	M	105	Jimulco, Coah.	0	56.1	16.4	112.2 $\pm$ 4.1	5.8 $\pm$ 0.14	269*	$\alpha$ and $\beta$
CM09	M	105	Emiliano Zapata, Dgo.	0	45.2	14.9	184.9 $\pm$ 6.3	7.0 $\pm$ 0.12	81.8	$\alpha$ and $\beta$
CM23	M	105	Matamoros, Coah.	0	60.6	11.1	156.7 $\pm$ 12.0	7.0 $\pm$ 0.21	0 <sup>†</sup>	$\alpha$ and $\beta$
CM21	M	ND	Ojuelos, Jal.	0	61.8	14.5	180.3 $\pm$ 15.5	4.4 $\pm$ 0.10	177	ND
CM26	M	ND	La Loma, Dgo.	ND	ND	ND	134.6 $\pm$ 5.6	6.6 $\pm$ 0.40	267	$\alpha$ and $\beta$
CM28	ND	ND	Sierra del Laurel, Ags.	0	54.3	16.7	50.6 $\pm$ 4.4	3.8 $\pm$ 0.06	45.3	$\alpha$ and $\beta$

ND: not determined due to lack of venom; TBL: total body length; Sex: F (female); M (male); MCD-P: Minimum coagulant dose plasma; HPA: hide powder azure; SVMP: snake venom metalloproteinases; Ags. Aguascalientes; Coah: Coahuila; Dgo: Durango; Jal: Jalisco; N. L.: Nuevo León; S.L.P.: San Luis Potosí; Tam: Tamaulipas; Zac: Zacatecas; <sup>†</sup> No coagulant activity was observed even after adding up to 400  $\mu\text{g}$  of venom; \* Only partial clot was detected.



## 2.2. SDS-PAGE

In general, *C. m. nigrescens* venoms had diverse electrophoretic pattern in terms of number and intensity of bands (Figure 2). Venoms from six individuals (CM02, CM04, CM06, CM08, CM16, and CM18) displayed a prominent band near 10 kDa that was absent or less intense in the remaining venoms. These six venoms belong to individuals with a TBL of less than 70 cm. These six venoms also lacked a series of bands located between 20 and 25 kDa (PI-SVMPs) that were detected in the remaining venoms. Other prominent differences were observed in the area located between 50 and 75 kDa (PIII-SVMPs), where 13 of the 27 individuals (CM03, CM07, CM11, CM12, CM13, CM14, CM15, CM16, CM18, CM198, CM21, CM27, and CM28) had a conspicuous band that was less intense in the remaining venoms (Figure 2).



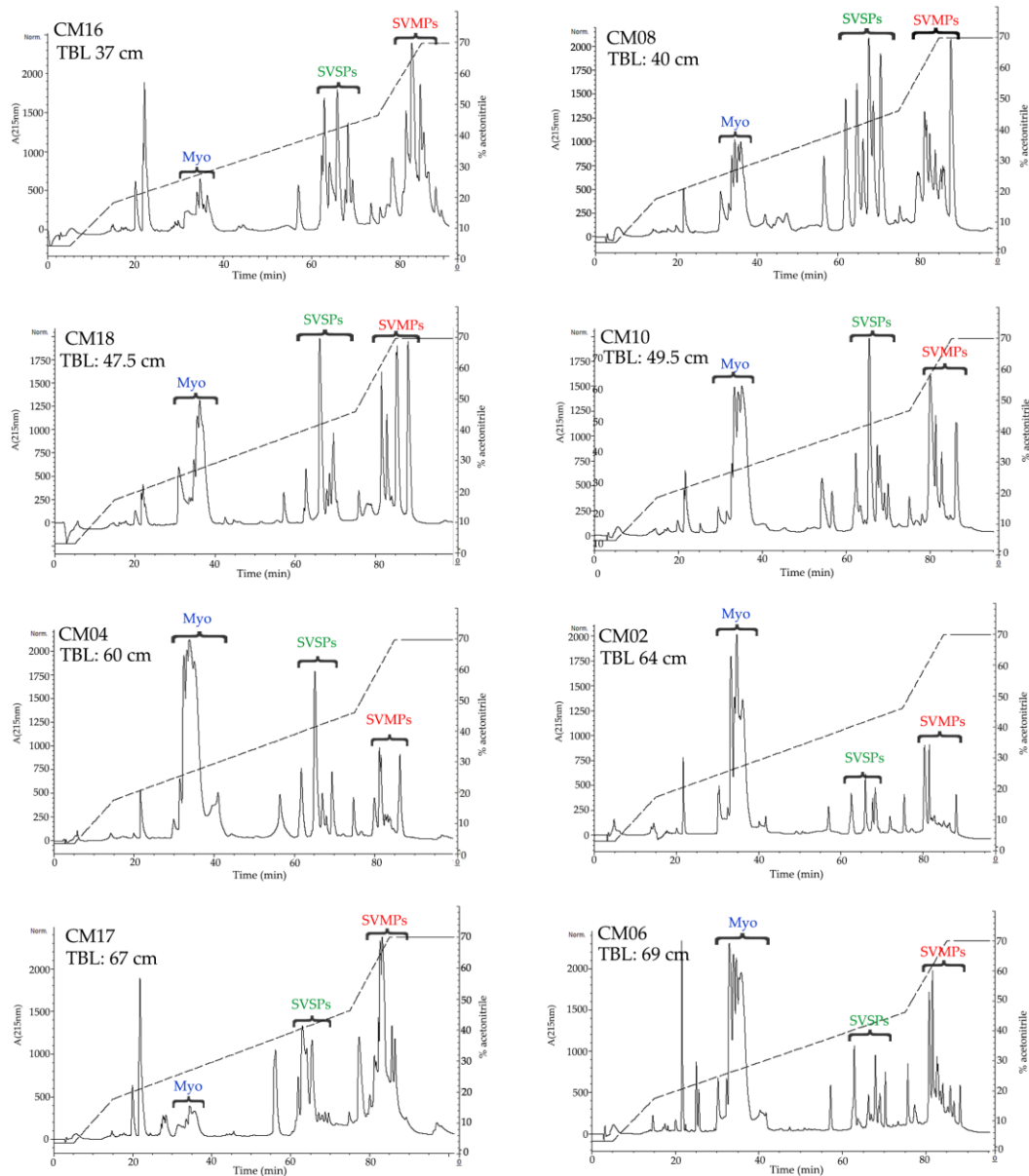
**Figure 2.** 15% SDS-PAGE of *C. m. nigrescens* venoms from Mexico under reducing conditions. Venoms of individuals with a TBL of less than 70 cm are marked with an asterisk (\*). Variation in the bands with molecular masses ~10 kDa, from 20 kDa to 25 kDa, and from 50 kDa to 75 kDa are marked with red, yellow and purple boxes, respectively. Based on western blot and ESI-MS analyses, these bands correspond to crotoamine like-myotoxins, PI-SVMPs, and PIII-SVMPs, respectively. 15 µg of venom was loaded per lane and gels were stained with Coomassie blue. kDa: kilodaltons.

## 2.3. Determination of the Primary Components in *C. m. nigrescens* Venoms

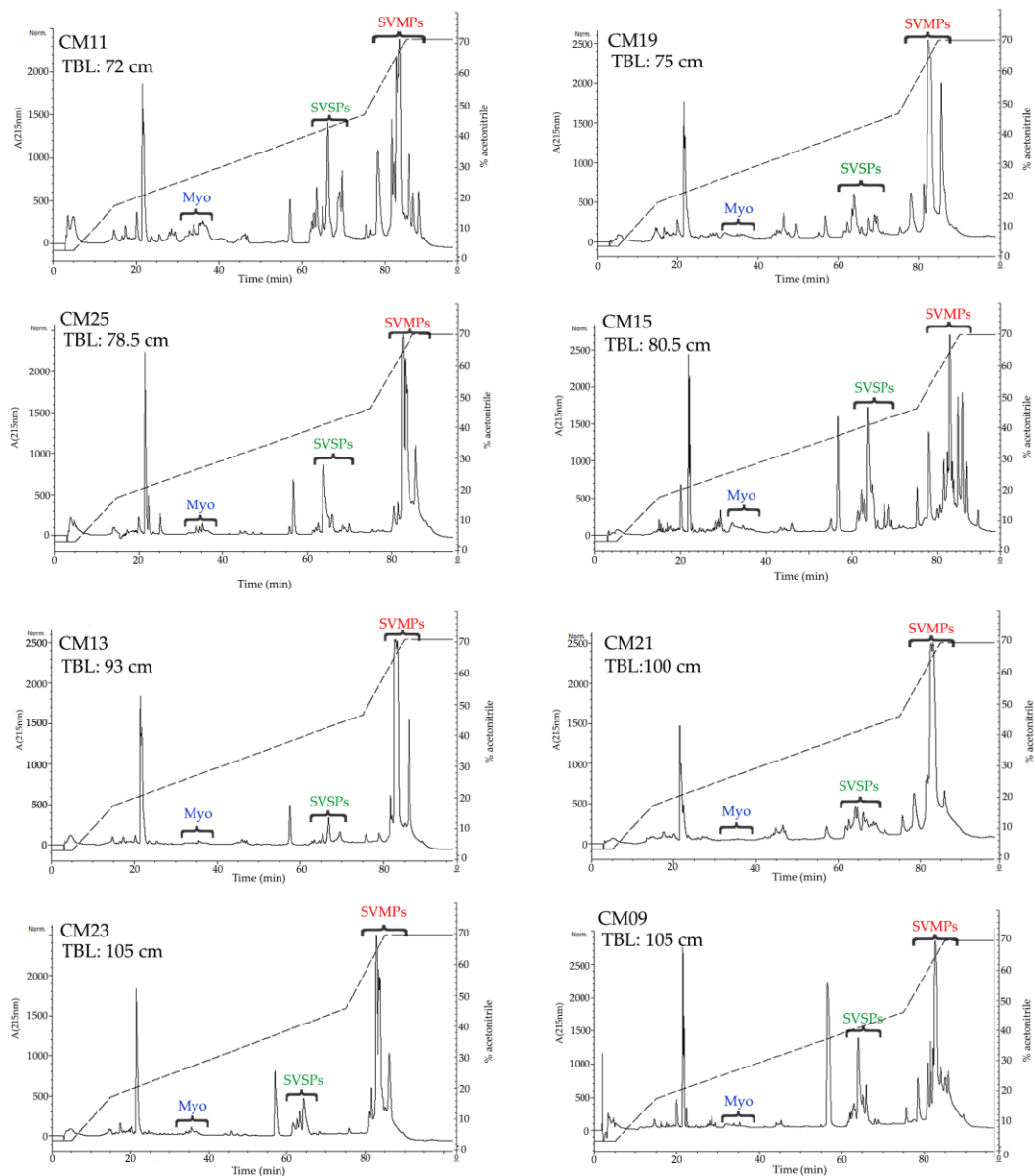
All but one venom sample was separated by RP-HPLC with the goal of visualizing differences in the protein profiles of the venoms (Figures 3 and 4, Figure S1). Clear differences were detected in the RP-HPLC profiles of *C. m. nigrescens* venoms related to the TBL of snakes. In general, chromatograms tended to be less complex, in terms of total number of fractions, in venoms of larger snakes with TBL >70 cm (Figure 4, Figure S1). Sixteen venoms had peaks between 30 and 40 min of elution that were absent in the other ten venoms (Figure 3, Figure S1). The seven largest measured individuals and the two unmeasured adults lacked these peaks and the thirteen smallest snakes had them. Of the snakes between 72.5 and 80 cm, only one lacked the peaks. Because peaks eluting from 30 to 40 min were highly abundant in the venom of CM04, we used this venom for further analysis to determine the composition of the peaks observed eluting from 30 to 40 min (Figure 5A) and correspond to proteins with an apparent molecular mass close to 10 kDa from SDS-PAGE (Figure 5B). From this venom (CM04), we collected fractions that eluted from 30 to 38 min (Fractions 6, 7, 8, 9, and 10; Figure 5A) and using ESI-MS mass spectrometry obtained seven proteins with molecular masses: 5129.17 Da (from fraction 6), 5071.90 Da (from fraction 6), 5143.14 Da (from fraction 7), 5180.00 Da (from fraction 7), 4958.53 Da (from fraction 8), 5143.60 Da (from fraction 9) and 5082.50 Da (from fraction 10) (Figure S2). In addition, fractions 6–10 all induced hind limb spastic paralysis in mice, a characteristic effect generated by crotoamine-like myotoxins. The i.v. LD<sub>50</sub> calculated for fraction 8 was 2.23 mg/kg. Additionally, through N-terminal sequencing of fraction 8, we determined that the partial protein sequence was comprised of 34 amino acids (YKRCLKKGHCFCFKTVICLPPSSDFGKMDCRWKW) and showed 100% match to the partial sequence of crotoamine 3 from *C. oreganus helleri* (Uniprot access: AEU60011.1).

Thus, molecular mass, N-terminal sequence, and biological activity indicate that fractions eluting between 30 and 40 min correspond to crotamine-like myotoxins.

A second area with differences in terms of number and relative abundance of fractions among chromatograms was located between 60 to 70 min (Figures 3 and 4, Figure S1). The western blot analysis of CM04 venom revealed that this area predominately contained SVSPs with a molecular mass between 25 kDa and 37 kDa (Figure 5C).



**Figure 3.** Reverse-phase HPLC chromatograms of representative *C. m. nigrescens* venoms of snakes less than 70 cm ordered by total body length (TBL). An analytic C18 reverse-phase column (Vydac<sup>®</sup>, Deerfield, IL, USA, 218 TP 4.6 mm × 250 mm) was used. Retention time is along the x axis for each panel and labeled every twenty min. Proteins were detected at 215 nm and absorbance is indicated on the left axis. The acetonitrile gradient is shown in the HPLC graph and the percentage value corresponds to the right axis for each panel. Crotamine-like myotoxins (Myo), snake venom serine proteases (SVSPs), and snake venom metalloproteinases (SVMs) are illustrated in blue, green and red, respectively.



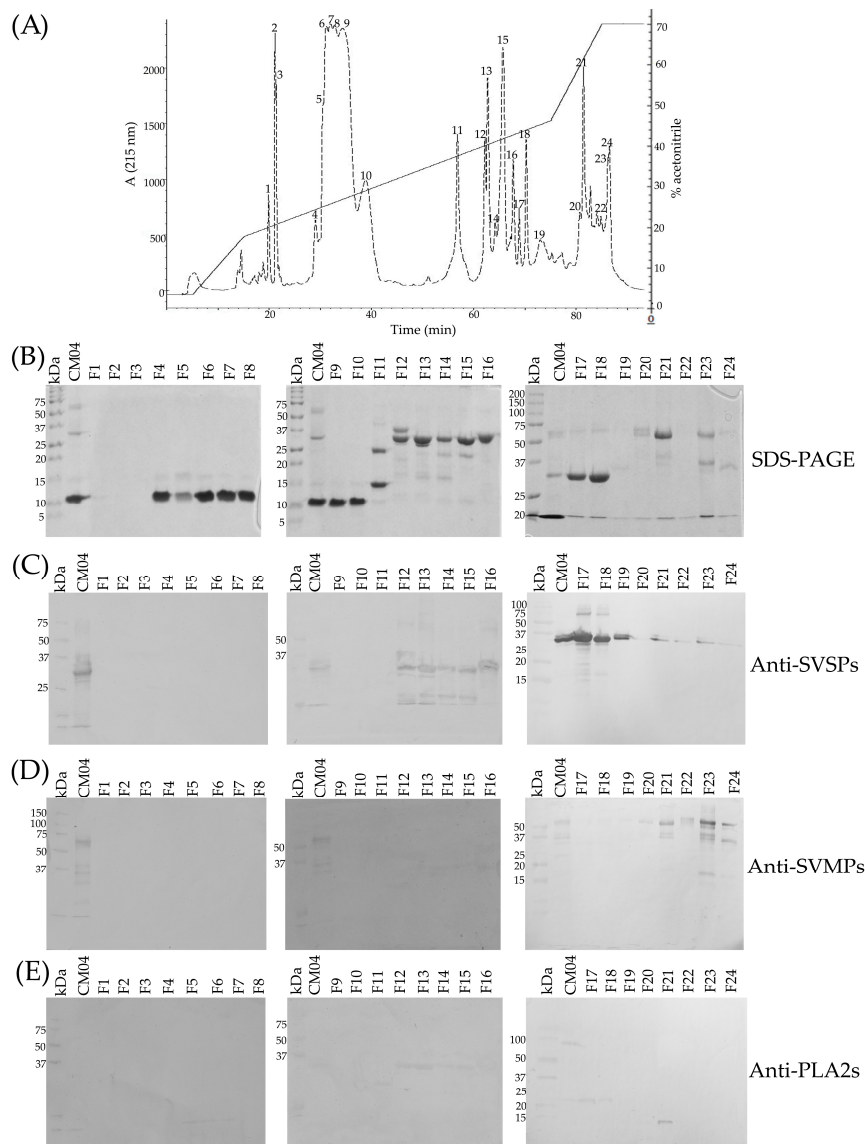
**Figure 4.** Reverse-phase HPLC chromatograms of representative *C. m. nigrescens* venoms of snakes greater than 70 cm ordered by total body length (TBL). An analytic C18 reverse-phase column (Vydac<sup>®</sup>, Deerfield, IL, USA, 218 TP 4.6 mm × 250 mm) was used. Retention time is along the x axis for each panel and labeled every twenty min. Proteins were detected at 215 nm and absorbance is indicated on the left axis. The acetonitrile gradient is shown in the HPLC graph and the percentage value corresponds to the right axis for each panel. The regions where crotonamine-like myotoxins (Myo), snake venom serine proteases (SVSPs), and snake venom metalloproteinases (SVMPs) elute are illustrated in blue, green and red, respectively.

The final elution region with clear variation was the region corresponding to fractions that eluted after 78 min (Figures 3 and 4, Figure S1). Using specific polyclonal antibodies against SVMPs, we determined that these fractions correspond to SVMPs with molecular masses in the range of 20 kDa to 75 kDa (Figure 5D).

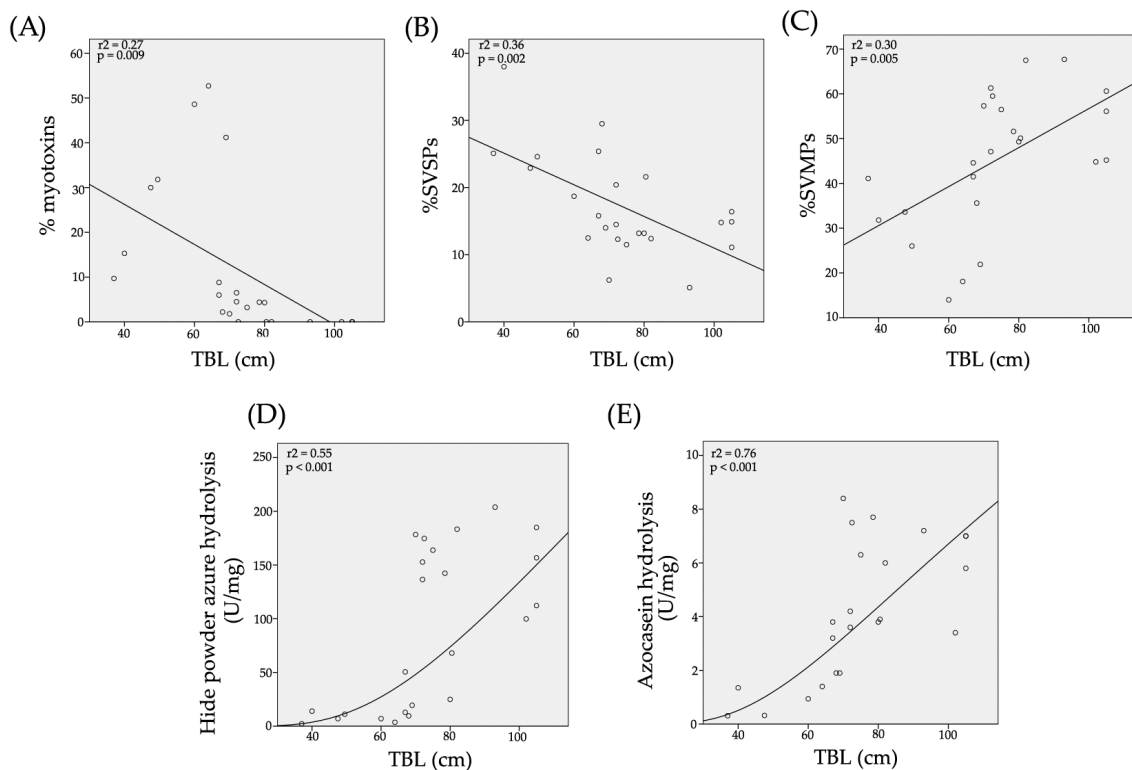
The percentage of crotonamine-like proteins in venoms, calculated from chromatograms, ranged from 1.8% to 52.7% (Table 1). Interestingly, a significant relationship ( $r^2 = 0.27$ ;  $p = 0.009$ ) between the relative abundance of crotonamine-like myotoxins in venoms and the TBL of snakes was identified. The percentage of myotoxins in venom became less abundant in larger snakes and completely



disappears in venoms of the largest snakes (Figure 6A). On the other hand, the calculated percentage of SVSPs in *C. m. nigrescens* venoms varied from 5.1% to 38% (Table 1) and again, there was a significant relationship ( $r^2 = 0.36$ ;  $p = 0.002$ ) with a reduction of SVSPs in venoms from larger snakes (Figure 6B). Finally, there was a significant relationship with TBL ( $r^2 = 0.30$ ;  $p = 0.005$ ) where SVMPs increased with greater TBL (Figure 6C; Table 1).



**Figure 5.** Elution profile of one representative *C. m. nigrescens* venom (CM04) by RP-HPLC, as well as SDS-PAGE and western blot analysis of its fractions. 5.5 mg of venom was fractionated on a C18 column. Twenty four fractions were collected (A) and separated by 15% SDS-PAGE under reducing conditions (B). All fractions were analyzed by western blot using polyclonal antibodies against SVSPs (C), SVMPs (D), and PLA<sub>2</sub>s (E). Antibodies were obtained from rabbit immunized with *C. simus* venom. RP-HPLC fractions 6, 7, 8, 9, and 10 were further analyzed by ESI-MS mass spectrometry to determine molecular mass of the proteins within those fractions. The acetonitrile gradient is shown in the HPLC graph and the percentage value corresponds to the right axis for each panel.



**Figure 6.** Approximate relative percentage of crotamine-like myotoxins (A), SVSPs (B), SVMs (C), and proteolytic activity over hide powder azure (D) and azocasein (E) of crude venoms of *C. m. nigrescens* as a function of snake total length. Solid lines are linear curves (A–C) and sigmoidal curves (D,E).

#### 2.4. Hide Powder Azure (HPA) Hydrolysis

All 27 *C. m. nigrescens* venoms analyzed had proteolytic activity on HPA. Venoms hydrolyzed the HPA in ranges from 2.2 U/mg (CM16) to 203.8 U/mg (CM13) (Table 1). A significant positive relationship ( $r^2 = 0.55$ ;  $p < 0.001$ ) between snake TBL and activity on HPA was detected. As the length of snakes increased, the proteolytic activity also increased (Figure 6D). Proteolytic activity of all venoms was completely abolished with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) indicating this activity is mediated by SVMs.

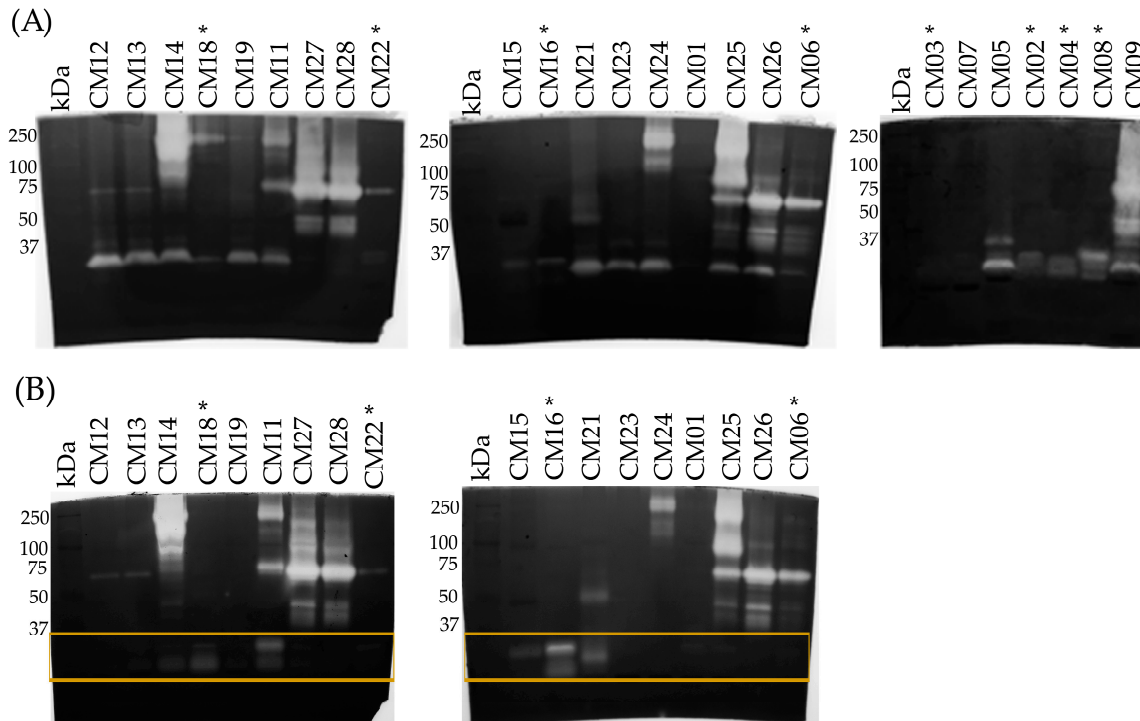
#### 2.5. Azocasein Hydrolysis

Similar to what was observed with the HPA substrate, the 26 venoms tested were able to hydrolyze azocasein with a significant positive relationship ( $r^2 = 0.76$ ;  $p < 0.001$ ) between snake TBL and azocasein hydrolysis (Figure 6E). Venoms showed azocaseinolytic activity in the range from 0.31 U/mg (CM16) to 8.4 U/mg (CM24) (Table 1). Azocaseinolytic activity was completely inhibited with EDTA indicating that this activity is completely mediated by SVMs.

#### 2.6. Gelatin Hydrolysis

To evaluate the gelatinolytic activity of venoms, zymograms with gelatin as the substrate were carried out on 25 of the 27 venoms. Venoms degraded gelatin in different regions of the gel and with different intensity (Figure 7A). Most of the venoms hydrolyzed gelatin below 37 kDa, however, gelatinolytic activity was more heterogeneous in the region above 37 kDa. For example, venoms such as CM09 and CM25 had proteolytic activity throughout the gel but many had low activity including CM01 (TBL: 105 cm), CM03 (TBL: 67 cm), CM07 (TBL: 80 cm), CM15 (TBL: 80.5 cm), CM16 (TBL: 37 cm), and CM22 (TBL: 68 cm). In general, venoms from snakes of smaller size (<70 cm) were less proteolytic than venoms of larger snakes (>70 cm); however, some venoms of individuals greater than

70 cm did not generate hydrolysis (CM01) or did in a reduced manner (CM07, CM15, and CM23) (Figure 7A). Gelatinolytic activity was only slightly inhibited with EDTA, indicating that proteases other than SVMPs (possibly SVSPs) generated most of the activity (Figure 7B).



**Figure 7.** (A) Gelatinolytic activity of crude venoms of *C. m. nigrescens*. 1 mg/mL of gelatin was added to the 12% SDS-PAGE. 10  $\mu$ g of venom were loaded per lane. Venoms of individuals with a TBL of less than 70 cm are marked with an asterisk (\*). Bands containing proteolytic activity are seen as a clear band on the dark background. kDa: kilodaltons. Gels were stained with Coomassie blue. (B) Gelatinolytic activity of crude venoms of *C. m. nigrescens* preincubated with 20 mM EDTA for 30 min at 37  $^{\circ}$ C. Panel B shows the disappearance of activity at <37 kDa (yellow boxes), particularly for venoms CM12, CM13, CM14 (partially), CM19, CM23, CM24, CM25, CM26 and CM06. Additionally, an inhibition of the activity in the high molecular weight region (>100 kDa) was observed for the venoms CM18, CM19 and CM21. These data indicate that there are metalloproteases of type PIII and PI or PII that have been inhibited under the aforementioned conditions.

### 2.7. Minimum Coagulant Dose (MCD-P)

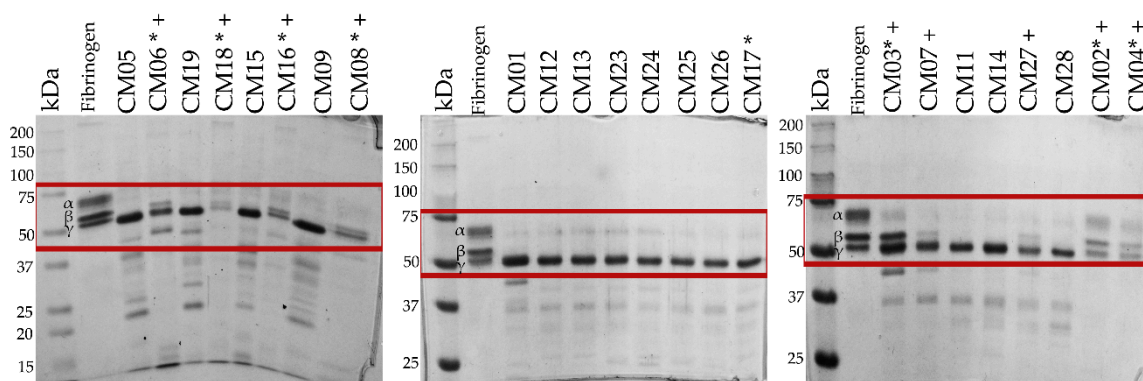
Twenty-four of the twenty-seven venoms produced a fibrin clot when they were incubated with human plasma, although at different rates. Of these, three venoms (CM01, CM14, and CM24) only formed partial clots while the remaining twenty-one venoms generated complete clots (Table 1). Three venoms (CM12, CM13, and CM23) of individuals greater than 70 cm TBL lacked coagulant activity despite adding 400  $\mu$ g of venom (Table 1). Although the venoms from CM19 and CM24 had procoagulant activity, it was not possible to determine their MCD-P because adding up to 400  $\mu$ g of venom only produced a blood clot after 10 min of reaction. The MCD-P of venoms ranged from 10.3  $\mu$ g to up to >400  $\mu$ g (Table 1). Noticeably, venoms of individuals with a TBL of less than 50 cm (CM08, CM10, CM16, and CM18) showed the highest procoagulant activity with values in the range of 10.3–24.6  $\mu$ g. Although, in general, venoms of smaller snakes exhibited more thrombin-like action on plasma, some venoms of snakes longer than 100 cm had coagulant activity (CM23 and CM09, MCD-P: 33.5  $\mu$ g and 81.8  $\mu$ g, respectively). Incubation of venoms with phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) completely abolished the coagulant activity of all venoms while incubation with EDTA did not inhibit



the activity. This indicates that coagulant activity is mediated by SVSPs and not by metal-dependent proteolytic enzymes like SVMSPs.

### 2.8. Fibrinogenolytic Activity

All 24 *C. m. nigrescens* venoms analyzed, hydrolyzed human fibrinogen; however, fifteen venoms hydrolyzed both the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of fibrinogen and nine venoms hydrolyzed only the  $\alpha$ -chain of fibrinogen (Table 1; Figure 8). Fourteen of the fifteen venoms that cleaved both fibrinogen chains belonged to individuals with a TBL greater than 70 cm, while seven of the nine venoms that only hydrolyzed  $\alpha$ -fibrinogen corresponded to snakes with a TBL of less than 70 cm (Table 1). Interestingly, venoms with  $\alpha$ -chain specificity formed a fibrin clot that was not observed in venoms with  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains affinity, which indicates that thrombin-like SVSPs are responsible of the fibrinogenolytic activity in these venoms.



**Figure 8.** Fibrinogenolytic activity of crude venoms of *C. m. nigrescens*. 150  $\mu$ g of fibrinogen were incubated with 5  $\mu$ g of each venom for 15 min at 37  $^{\circ}$ C. Venoms of individuals with a TBL of less than 70 cm are marked with an asterisk (\*). Venoms marked with a cross (+) generated a fibrinogen clot. Fibrinogenolytic activity was visualized on 12% SDS-PAGE and it is marked with a red box. 10  $\mu$ g of fibrinogen/venom mix were loaded per lane. kDa: kilodaltons. Gels were stained with Coomassie blue.

### 2.9. Median Lethal Dose ( $LD_{50}$ )

To reduce the number of mice sacrificed, only nine representative venoms were analyzed for  $LD_{50}$ . *C. m. nigrescens* venoms had toxicity in the range of 1.13 mg/kg to 4.3 mg/kg (Table 2). Five of the six venoms of snakes with a TBL of less than 70 cm were significantly more toxic (with a median  $LD_{50}$  of 1.5 mg/kg) than venoms of snakes with a TBL greater than 70 cm (with a median  $LD_{50}$  of 4.03 mg/kg;  $U = 0.00$ ;  $p = 0.03$ ). The one venom (CM04), corresponding to an individual with a size of 60 cm, had a  $LD_{50}$  of 4.1 mg/kg. This toxicity value was similar to those displayed by venoms of snakes with a TBL greater than 70 cm (Table 2). In addition, venoms from snakes less than 70 cm (CM03, CM04, CM06, CM08, CM16 and CM18), provoked hind limb spastic paralysis of all mice injected. This effect was not observed in the mice injected with venoms from snakes greater than 70 cm (CM09, CM15 and CM19).

**Table 2.** Toxicity and minimum hemorrhagic dose (MHD) of representative *C. m. nigrescens* venoms from Mexico.

ID	TBL (cm)	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	MHD (μg)	Neutralization (ED <sub>50</sub> ) Antivipmyn® (μLAV/3LD <sub>50</sub> )	Neutralization (ED <sub>50</sub> ) Faboterapico Polivalente Antiviperino® (μLAV/3LD <sub>50</sub> )
CM16	37	1.26 *	6.10	ND	ND
CM08	40	1.71 *	19.30	ND	ND
CM18	47.5	1.13 *	4.0	222.0 (204.4–241.1) **	240.1 (184.1–313.1) **
CM04	60	4.10 *	>25	ND	ND
CM03	67	1.71 *	ND	ND	ND
CM06	69	1.72 *	21.90	246.2 (214.1–283.0) **	158.0 (121.7–205.1) **
CM19	75	4.20	10.26	>450	>450
CM15	80.5	3.60	8.30	ND	ND
CM09	105	4.30	10.95	322.1 (309.3–335.3)	411.1 (401.7–420.7)

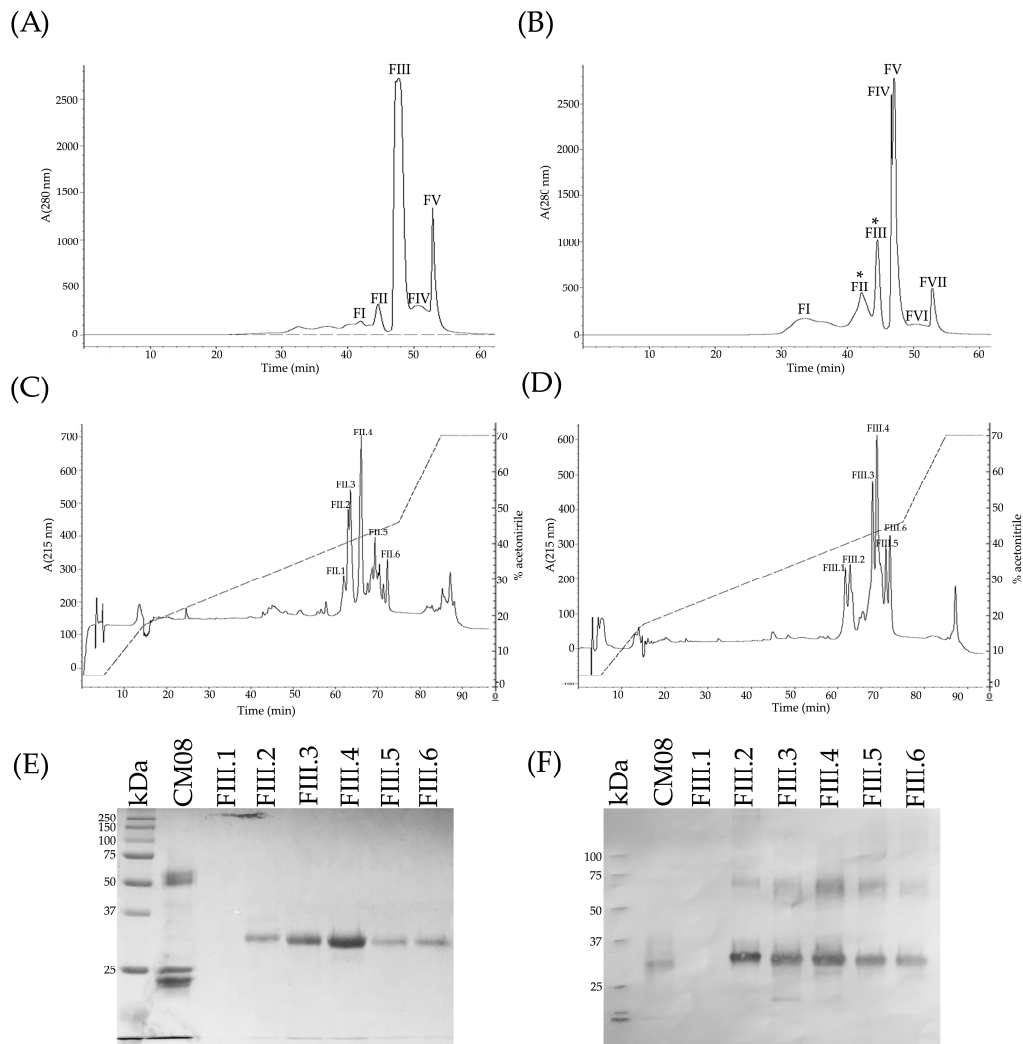
\* Provoked hind limb spastic paralysis of all mice injected during LD<sub>50</sub> tests. \*\* Mice presented hind limb spastic paralysis during neutralization studies. ED<sub>50</sub>: effective dose 50%; neutralizing potency expressed as microliters of antivenom that neutralized 3 times the median lethal dose (LD<sub>50</sub>). >450: Mice did not survive with volumes less than or equal to 450 μL. ND: not determined.

#### 2.10. Minimum Hemorrhagic Dose (MHD)

To reduce the number of mice sacrificed, only eight representative *C. m. nigrescens* venoms were analyzed for MHD. With the exception of the venom from CM04 which lacked hemorrhagic activity despite injecting up to 25 μg, the remaining venoms displayed hemorrhagic activity (Table 2). The most hemorrhagic venoms were CM18, CM16, and CM15 with MHD values of less than 4.0 μg, 6.1 μg and 8.3 μg, respectively. Of the remaining venoms with hemorrhagic activity, venom CM06 was the least active with a MHD of 21.9 μg (Table 2). In addition, no apparent relationship between hemorrhagic activity and TBL of snakes was observed.

#### 2.11. Toxic Components in Juvenile *C. m. nigrescens* Venoms

With the goal of determining the toxic components in venoms from juvenile snakes, CM04 and CM08 venom were separated by size-exclusion chromatography. Five and seven fractions were obtained from CM04 and CM08 venoms, respectively (Figure 9A,B, respectively). Only fraction three (FIII) from CM04 venom and fractions two, three and four (FII, FIII and FIV) from CM08 venom were able to kill mice after 60 μg were injected i.v. (Table 3). However, only FIII from CM08 venom is toxic to mice after injecting only 20 μg (Table 3). Interestingly, while FIII from CM04 and FIV from CM08 caused hind limb spastic paralysis when injected in mice (indicating that they contained crotoxin-like myotoxins), FII and FIII from CM08 did not induced this effect but instead induced ophisthosis and bleeding. Thus, FII and FIII from CM08 venom were further separated by RP-HPLC (Figure 9C,D, respectively). Both molecular exclusion fractions eluted proteins in the range from 60 to 72 min by RP-HPLC, however all RP-HPLC fractions lost their toxic activity in mice (possibly due to protein denaturalization by acetonitrile used in RP-HPLC) since they were unable to kill mice despite adding 25 μg. SDS-PAGE revealed that RP-HPLC fractions obtained from CM08 FIII contain a unique band between 25 kDa and 37 kDa (Figure 9E) and it was demonstrated by western blot using polyclonal antibodies against SVSPs that this band correspond to SVSPs (Figure 9F). Unexpectedly, an additional band between 50 kDa and 75 kDa was observed in the western blot, indicating that at least two SVSPs generated most of the toxicity in juvenile snakes (Figure 9F).



**Figure 9.** Size-exclusion chromatography of CM04 and CM08 venoms, RP-HPLC of size-exclusion fractions, and SDS-PAGE and western blot of RP-HPLC fractions. Nine and five milligrams of venoms CM04 (A) and CM08 (B), respectively, were loaded in a Cosmosil column (Diol-300, 7.5 × 600 mm) and eluted by size-exclusion chromatography. Two-hundred micrograms of FII (C) and FIII (D) fractions (the most toxic fractions to mice) from CM08 venom were further separated by RP-HPLC. RP-HPLC fractions from FIII were analyzed by SDS-PAGE (E) and western blot (F) using polyclonal antibodies against SVSPs. Two SVSPs with molecular masses in the range from 25 kDa to 75 kDa were detected by western blot, indicating that SVSPs are responsible for generating most of the toxicity in juvenile snakes.

**Table 3.** Toxicity on mice of size-exclusion chromatography fractions from CM04 and CM08 venoms.

Fraction/Venom	Mortality with Different Amounts of Venom (µg/mice)					
	CM04 (60)	CM08 (60)	CM04 (45)	CM08 (45)	CM04 (20)	CM08 (20)
FI	0/3	0/3	NA	NA	NA	NA
FII	0/3	3/3	NA	1/3	NA	0/3
FIII	3/3	3/3	1/3	2/3	0/3	1/3
FIV	0/3	3/3	NA	1/3	NA	0/3
FV	0/3	0/3	NA	NA	NA	NA
FVI	NA	0/3	NA	NA	NA	NA
FVII	NA	0/3	NA	NA	NA	NA

NA: Not applicable.

### 2.12. Detection of Crotoxin-Like Neurotoxins at the Protein Level

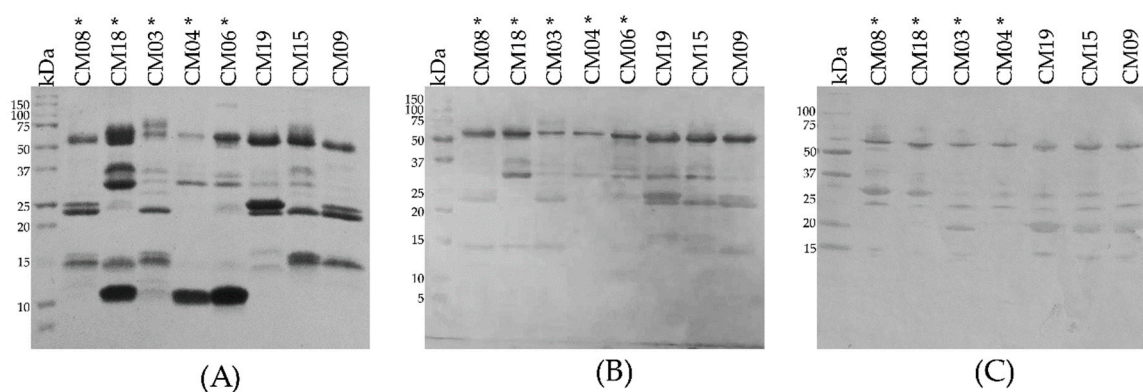
To determine if neurotoxins similar to Crotoxin/Mojave toxin were present at the protein level, an ELISA analysis was made using monoclonal antibodies against the basic subunit of crotoxin. As previously reported in literature, none of the *C. m. nigrescens* individuals were positive for neurotoxins in their venom [62,63]. As expected, the Type A *C. s. scutulatus* venom used as a control was positive for Mojave toxin.

### 2.13. Neutralization Studies

Neutralizing activity of Mexican antivenoms Antivipmyn<sup>®</sup> and Faboterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup> were evaluated using venoms from four *C. m. nigrescens* individuals with different TBL (CM06, CM09, CM18 and CM19). In general, both antivenoms neutralized venoms of juvenile snakes (CM06 and CM18) better than venoms of the adults (CM09 and CM19). Antivipmyn<sup>®</sup> neutralized three of the four venoms tested, with effective dose (ED<sub>50</sub>) values of 246.2 µL/3LD<sub>50</sub>, 322.1 µL/3LD<sub>50</sub> and 222.0 µL/3LD<sub>50</sub> for CM06, CM09 and CM18 venoms, respectively (Table 2). Similarly, Faboterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup> neutralized the same three venoms that Antivipmyn<sup>®</sup> did. The ED<sub>50</sub> values obtained were 158.0 µL/3LD<sub>50</sub>, 411.1 µL/3LD<sub>50</sub> and 240.1 µL/3LD<sub>50</sub> for CM06, CM09 and CM18 venoms, respectively. Neither of the two antivenoms were able to neutralize the CM19 venom despite adding up to 450 µL of each antivenom. In addition, hind limb spastic paralysis induced by the myotoxins in CM06 and CM18 venoms was not neutralized by any antivenom.

### 2.14. Immune Recognition of Antivenom

Although most proteins were recognized by the Mexican antivenoms Antivipmyn<sup>®</sup> and Faboterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup> (Figure 10B,C, respectively), proteins with molecular masses lower than 20 kDa were weakly or not recognized. Importantly, crotoxin-like myotoxins (~10 kDa by SDS-PAGE, Figure 10A) of juvenile venoms (CM04, CM06 and CM18) were not recognized by antivenoms, a result congruent with what was observed in the neutralization test where antivenoms did not neutralize the activity of these proteins.



**Figure 10.** SDS PAGE and western blot analysis of representative *C. m. nigrescens* venoms. (A) Venoms (10 µg) were separated by 15% SDS-PAGE. Venoms (5 µg) on nitrocellulose were detected with Antivipmyn<sup>®</sup> (B) and Faboterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup> (C). Venoms of individuals with a TBL of less than 70 cm are marked with an asterisk (\*).

## 3. Discussion

The number and relative abundance of the protein families in rattlesnake venom varies broadly at the intraspecific level. The factors commonly associated with intraspecific venom variation are the snake's age and their geographic distribution [13,32,64,65]. In our study, we detected clear variation, in terms of relative abundance and presence/absence of proteins specifically associated with the length of individual snakes. The protein profiles of *C. m. nigrescens* venoms as demonstrated by SDS-PAGE



and RP-HPLC analyses, showed marked differences in venoms from snakes of different sizes classes. The most abundant components in *C. m. nigrescens* venoms were SVMPs, SVSPs, and crotamine-like myotoxins. However, the proportion of each of these components was variable among venoms from smaller and larger snakes, where small snakes displayed more crotamine-like myotoxins and SVSPs compared to larger snakes, but the opposite occurred with SVMPs (Figure 6A–C; Table 1). In the current study, the threshold of venom change of *C. m. nigrescens* was at approximately 70 cm TBL. Snakes with a size below this threshold were, in general, more toxic and procoagulant, but less proteolytic. In addition, snakes with TBL less than 70 cm had venoms containing crotamine-like myotoxins that were reduced or absent in the snakes with a TBL greater than 70 cm. It is likely that the ontogenetic venom change observed in *C. m. nigrescens* corresponds with its sexual maturity, since this subspecies acquires sexual maturity at approximately 70 cm of TBL [51].

Crotamine is a small, non-enzymatic protein composed of about 42 amino acids (4.8 kDa) that was first isolated in the venom of *C. durissus terrificus* [66]. Among other effects, crotamine is capable of inducing spastic paralysis in the hind limbs of mice that are injected with the toxin and generates necrosis in muscle cells [67,68]. Previously, it had been reported that some rattlesnakes species, including *C. m. nigrescens*, contain crotamine-like myotoxins (e.g.,  $\alpha$ -myotoxins) in their venom [57]. In the current study, sixteen *C. m. nigrescens* venoms contained crotamine-like myotoxins in different proportion as demonstrated by RP-HPLC (Figure 3, Figure S1; Table 1). Interestingly, venoms of snakes larger than 80 cm completely lacked this small toxin (Figure 4, Figure S1; Table 1). In addition, only venoms containing crotamine-like myotoxins were able to cause hind limb spastic paralysis of all mice injected. Crotamine-like myotoxins were also visualized by SDS-PAGE as a prominent band near 10 kDa in venoms with the highest percentage of these proteins (e.g., CM02, CM04, CM06, CM08, CM16, and CM18). This apparent molecular mass obtained by SDS-PAGE is similar to those described in other analyses for this basic protein [23,47,69]. From venom CM04, we isolated at least seven crotamine-like myotoxin isoforms with molecular masses ranging from 4958.53 Da to 5180.00 Da and obtained the N-terminal sequence of one of them. Presence of multiple forms of crotamine-like myotoxins in the same venom has been reported in other *Crotalus* venoms and these isoforms can differ only in few amino acids [70], what could explain the variation in the molecular masses of the isoforms detected in *C. m. nigrescens* venom. Additionally, the i.v. LD<sub>50</sub> calculated for one of these isoforms was 2.23 mg/kg, a value within the range reported for the toxicity of crotamine (from 0.07 to 32.76 mg/kg) [67]. Presence of myotoxins in the venom of juvenile snakes and their consequent reduction in adult snakes has been reported in *C. adamanteus* and *C. tzabcan* (the juvenile has 34% while the adult has 18.5% of myotoxins) [15,49]. However, an inverse pattern has been detected in *C. oreganus concolor* and *C. viridis viridis*, where venoms of adult individuals expressed a greater amount of myotoxins compared to juvenile snakes [14,71].

Thrombin-like SVSPs (TL-SVSPs) are able to hydrolyze both  $\alpha$  and  $\beta$  chains of fibrinogen, releasing fibrinopeptides A and B, respectively, but most of them preferentially act upon only on one of the fibrinogen chains [72]. On the other hand, fibrinogenases can be classified as  $\alpha$ -fibrinogenases and  $\beta$ -fibrinogenases, where the first group hydrolyses preferentially (although not exclusively)  $\alpha$ -chain of fibrinogen, while the second group has more affinity for  $\beta$ -chain of fibrinogen. Unlike TL-SVSP, fibrinogenases do not release fibrinopeptides A or B, do not induce fibrin clot formation and most of them are SVMPs [73,74]. All venoms of *C. m. nigrescens* analyzed had fibrinogenolytic activity. Interestingly, while fifteen venoms (most of them corresponding to snakes with a TBL greater than 70 cm) hydrolyzed both the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of fibrinogen, ten venoms (most of them belonging to snakes with a TBL of less than 70 cm) hydrolyzed only the  $\alpha$ -chain of this plasmatic protein and generated a fibrin clot. In addition, *C. m. nigrescens* venoms of snakes with a TBL less than 60 cm were the most procoagulant on human plasma with MCD-P values in the range of 10.3  $\mu$ g to 24.6  $\mu$ g. Pre-incubation of venoms with SVSPs inhibitor (PMSF) completely inhibited the coagulant activity of venoms, indicating that this activity is mediated solely by SVSPs. Similar results has been reported in species such as *C. durissus cumanensis* [18] and *C. d. terrificus* [75] where venoms from neonate

or juvenile snakes had MCD-P lower (more coagulant) than venoms of adult snakes. These results suggest that fibrinogenases are responsible for activity in *C. m. nigrescens* venoms breaking both  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains of fibrinogen, while TL-SVSPs would be responsible of the activity in venoms with affinity only for the  $\alpha$ -chain of fibrinogen.

Within *C. m. nigrescens*, there was also an increase in the relative abundance of SVMPs in venom as the snakes increase in TBL. Similarly, a positive significant relationship was found between TBL of snakes and the proteolytic activity on HPA and azocasein of their venoms. Specifically, the longer the snake, the greater the proteolytic activity. Thus, taking into account that EDTA completely inhibited the proteolytic activity over both substrates, it is likely that the increase in proteolytic activity in venoms as the snakes get longer is related to the increase in the content of SVMPs in venom. Interestingly, gelatinolytic activity did not increase with the length of snakes and was not completely inhibited by EDTA which indicates that not only metal dependent proteolytic enzymes are associated with this activity. An increase of SVMPs abundance and proteolytic activity with increasing snake size has been reported in venom of other rattlesnakes such as *C. oreganus helleri*, *C. o. oreganus*, *C. polystictus*, and *C. simus* [19,21,23]. Though, species such as *C. o. concolor* and *C. viridis viridis* exhibit a reduction in the amount and activity of SVMPs as the snakes increase their longitude [14,71].

It has been proposed that juvenile snakes require toxic venoms to ensure rapid prey immobilization when prey abundance is limited and since eating frequently allows them to reach the adult stage (a less vulnerable stage against predators) more rapidly [15,76]. Comparatively, for adults that feed on larger prey, having venoms rich in proteases (e.g., metalloproteases) is more important to properly digest their prey than having toxic venoms [15,76]. In *C. m. nigrescens*, most of the venoms of snakes with a TBL of less than 70 cm were more toxic and were equally hemorrhagic compared to venoms of snakes with larger size. The main components related to toxicity in small *C. m. nigrescens* snakes were SVSPs (with molecular masses between 25 kDa and 75 kDa) and coincidentally, venom of juvenile snakes contained, in general, more SVSPs than venom of adult snakes. In addition, mice injected with these SVSPs showed opisthotonos and bleeding. A group of TL-SVSPs (e.g., gyroxin, crotalase, ancrod, leucurobin, and LM-TL) with molecular masses in the range from 30 kDa to 60 kDa produce temporary episodes characterized by opisthotonos and rotations around the long axis of mice [77,78] and can have high toxicity (e.g., LD<sub>50</sub> of 0.07  $\mu$ g/g in mice) [77]. Our results suggest that a combination of myotoxic (crotamine-like myotoxins), procoagulant (TL-SVSPs) and hemorrhagic (SVMPs) components could induce faster paralysis and death in prey of juveniles *C. m. nigrescens*, compared to venoms of adult snakes that lack myotoxins and have limited or no procoagulant activity.

Although venom variation related to age of snakes was demonstrated for *C. m. nigrescens*, venom variation related to geographic distribution was not as clear. In general, *C. m. nigrescens* individuals with similar TBL but from different localities from Mexico displayed similar venoms in terms of protein profile, toxicity, and proteolytic activity related to SVMPs. Gelatinolytic, fibrinogenolytic, and coagulant activities were more variable among venoms but even in these activities no patterns were associated with geographic distribution. Rattlesnake venoms can be classified in two groups according to their toxicity and SVMP mediated proteolytic activity, where Type I corresponds to venoms with low or moderate toxicity and high proteolytic activity, while Type II venoms are more toxic and less proteolytic [76]. Nevertheless, this classification can be made more complex if we take into account that the main components of these venom groups, such as neurotoxins, SVMPs, and myotoxins, can vary widely in terms of presence and relative abundance [25,34]. Further, some rattlesnake species, such as *C. helleri*, *C. horridus*, *C. scutulatus*, and *C. simus*, can have populations with Type I, Type II, and/or Type I + II venoms [31,33,34,47,79,80]. Taking into account their low toxicity (compared to neurotoxic venoms), high proteolytic activity and lack of the Mojave toxin (in agreement with other reports [62,63]), *C. m. nigrescens* venoms would be classified exclusively as Type I.

Both Mexican antivenoms (Antivipmyn<sup>®</sup> and Faboterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup>) effectively neutralized lethal activity of two juvenile *C. m. nigrescens* venoms. However, the western blot analysis revealed that both Mexican antivenoms did not recognize proteins with molecular mass

close to 10 kDa (e.g., crotamine-like myotoxins) from juvenile *C. m. nigrescens* venoms, suggesting that both antivenoms lack specific antibodies against these small proteins. Another possibility is that epitopes in small proteins (~10 kDa) were disrupted due to the reduced conditions used in SDS-PAGE, so that antivenoms were not able to recognize them. However, neither antivenom neutralized the activity of crotamine-like myotoxins *in vivo*, suggesting that antivenoms did not recognize and were unable to neutralize denatured or native small proteins. In contrast, both antivenoms had difficulties neutralizing lethality of venoms of adult snakes; one of the adult venoms was not neutralized by either antivenom. It has been reported that venoms that have high LD<sub>50</sub>s need greater volume of antivenom to neutralize the venom which could explain the lack of neutralization for one adult. For example, *C. culminatus* venom with LD<sub>50</sub>s ranging from 66 to 162 µg/mouse is not neutralized with volumes less than equal to 460 µL of antivenom [81]. The opposite relationship has been reported for snake species such as *Bothrops asper* and *C. durissus durissus*, where antivenoms from Costa Rica were less effective neutralizing newborn snake venoms compared to adult ones [17,82]. Other studies have demonstrated that some experimental antivenoms from Costa Rica reacted weakly with proteins with molecular masses lower than 20 kDa of *B. asper* venom [83]. Nevertheless, CroFab<sup>®</sup> antivenom did recognize myotoxin of a juvenile and adult *Crotalus viridis viridis* venoms [71], indicating that a representative selection of immunization mixtures in antivenoms production is crucial to have antibodies able to neutralize intraspecific venom variation. Results suggest that Mexican antivenoms could have problems neutralizing human envenomation by some adult *C. m. nigrescens* and a higher than normal dose would be necessary to effectively neutralize the venom.

#### 4. Conclusions

It has been demonstrated that rattlesnakes species such as *C. o. helleri*, *C. o. oreganus*, *C. o. concolor*, and *C. v. viridis* undergo ontogenetic changes in their diet, in which they go from feeding mainly on ectothermic animals (e.g., lizards) in juvenile stage to consume endothermic animals (e.g., mammals) in the adult stage [14,19,71]. These same species undergo a marked change in the composition of their venom in relation to age, indicating that diet plays an important role in the regulation of expression of protein families in venom. Based on what is known in the *C. molossus* complex about diet [54,55], it is likely that venom compositional changes are due to diet differences through time.

Therefore, it is possible to hypothesize that the ontogenetic venom variation observed in the current study could be associated, at least in part, with differences in prey consumed by this subspecies during its life cycle. However, it is necessary to corroborate this hypothesis with a diet analysis.

Based on this study and previous studies on rattlesnake venom variation, rattlesnakes appear to evolve unique strategies given different environmental pressures exerted on them. In the case of *C. m. nigrescens*, an ontogenetic venom change seems to be more advantageous than changes in the venoms of adult individuals across their distribution. It is likely that further analysis of venom in the remaining subspecies (*C. m. estebanensis*, *C. m. molossus*, and *C. m. oaxacus*) and species (*C. ornatus*, *C. basiliscus*, and *C. totonacus*) in the *Crotalus molossus* species complex will find the same pattern that we did in *C. m. nigrescens*.

#### 5. Materials and Methods

##### 5.1. Ethics Statement

We followed the guidelines described by the live animal use committees of the Facultad de Ciencias Biológicas at UJED, the Universidad Nacional Autónoma de México, and the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) of Mexico as well as developing our protocols in accordance with the American Society of Ichthyologists and Herpetologists guidelines for use of live amphibians and reptiles. SEMARNAT issued collecting permits (SGPA/DGVS/002288/18, 01090/17 and 03562/15; 13 March 2018; 10 February 2017; 7 April 2015, respectively, for samples collected in Mexico.

### 5.2. *Crotalus Molossus Nigrescens* Sampling

Snakes were captured in the field, venom was sampled, and then the animal was immediately released after venom extraction and measurements were taken. Samples were obtained from twenty-seven *C. m. nigrescens* from eight states (Aguascalientes, Coahuila, Durango, Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas and Zacatecas) in Mexico (Table Table 1). When possible, total body length (TBL) was measured and sex determined for each snake. Venom was extracted manually by allowing each snake to bite sterile 100 mL plastic containers covered with parafilm. Venoms were centrifuged at 14,000 rpm for 1 min to remove debris and the supernatant was lyophilized and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use. Tests using mice were carried out only with representative venoms to reduce the number of animals sacrificed.

### 5.3. Protein Concentration Determination

The protein concentration of each venom was obtained using the Pierce<sup>®</sup> Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's instructions and using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### 5.4. SDS-PAGE

15% polyacrylamide gels were made on a Miniprotean III system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the discontinuous system. Fifteen micrograms of each venom were dissolved in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% SDS, 10% glycerol, and 0.002% bromo-phenol blue) and then we added 5%  $\beta$ -mercaptoethanol. Each of the 27 samples were boiled for 5 min and run at 120 V. Gels were stained with 0.2% Coomassie brilliant blue R-250, 10% acetic acid, and 25% methanol for 8 h and rinsed in 10% acetic acid and 10% methanol [33]. Standard molecular mass markers (Bio-Rad, Carlsbad, CA, USA) were used as references.

### 5.5. Reverse-Phased High Performance Liquid Chromatography HPLC

Separation of 26 venom samples by RP-HPLC was carried out on an analytic C18 reverse-phase column (Vydac<sup>®</sup>, Deerfield, IL, USA, 218 TP 4.6 mm  $\times$  250 mm) using an Agilent 1100 chromatograph. One milligram of each venom was dissolved in 1.7 mL of water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA). Elution was performed as described by Castro et al. [47] at 1 mL/min by applying a gradient toward solution B (acetonitrile, containing 0.1% TFA), as follows: 0% B for 5 min, 0 to 15% B over 10 min, 15 to 45% B over 60 min, 45 to 70% B over 10 min, and 70% B for 9 min. Proteins were detected at 215 nm.

### 5.6. Identification of Protein Families in Representative *C. m. nigrescens* Venom by Western Blot

In order to determine the identity of the main fractions obtained from the RP-HPLC, fractions and whole CM04 venom were analyzed by western blot using polyclonal antibodies against SVMPs, SVSPs and PLA<sub>2</sub>s. Antibodies against SVMPs, SVSPs, or PLA<sub>2</sub>s were obtained from serum of rabbits hyperimmunized with *C. simus* venom. An immunopurification step was carried out to get specific antibodies against every protein family. Depending of the antibodies, a final step of negative immunopurification was used to remove antibodies with cross-reactivity or residual cross-contamination to SVMPs, SVSPs, or PLA<sub>2</sub>s.

Western blot was carried out as follow. Two micrograms of each fraction and five micrograms of whole venom were separated by 15% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-blot 0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad, Merck, Cork, Ireland) using a model HEP-1<sup>®</sup> semi-dry immunotransference chamber (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA). After transference at 420 mA for 1 h, the membrane was blocked with 5% non-fat dry milk diluted in TBST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20, pH 8.4) for 2 h. The membrane was then rinsed three times with TBST and incubated by shaking gently for 1 h at room temperature with



antibodies against SVMPS, SVSPs, or PLA<sub>2</sub>s diluted 1 µg/mL in TBST. After three washes with TBST, the membrane was incubated at room temperature for 1 h with goat antibodies against rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase (Invitrogen, Eugene, OR, USA) diluted 1:7000. The membrane was again rinsed with TBST and then developed by adding the BCIP/NPT substrate for alkaline phosphatase (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) [33].

#### 5.7. Molecular Mass and N-Terminal Sequence Determination of Crotonamine-Like Myotoxins

We determined the intact masses of crotonamine-like myotoxins of venom from one individual (CM04) using ESI-MS on an LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer. Amino-terminal sequencing of one crotonamine-like myotoxin (RP-HPLC fraction 8) was determined by automated Edman degradation on a PPSQ-31A Protein Sequencer (Shimadzu, Tokyo, Japan).

#### 5.8. Hide Powder Azure (HPA) Hydrolysis

We used the Hide Powder Azure (HPA) hydrolysis assay to determine proteolytic activity for each of the 27 samples. Hydrolysis of HPA was determined by adding 25 µg of venom to 1 mL of a solution containing 5 mg of HPA in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0. After 2 h of incubation, the reaction was stopped by centrifugation at 14,000 rpm for 5 min. The supernatant was obtained and the absorbance at 595 nm was measured. The absorbances of samples corresponding to HPA solutions incubated with 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, were subtracted from the absorbances of venom-containing samples. Analyses were conducted in triplicate. A standard curve of HPA hydrolysis was created by adding 50 µL of trypsin (2 mg/mL) to three concentrations of HPA (2, 4 and 6 mg/mL) and venom enzymatic activity was calculated using the standard curve. A unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of venom necessary to digest 1 mg of HPA in a 2 h period at room temperature and reported as specific activity (U/mg) [33].

#### 5.9. Azocasein Hydrolysis

Proteolytic activity of 26 venoms was evaluated using azocasein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as the substrate, as described by Castro et al. [47]. Ten micrograms of venom, dissolved in 20 µL 0.15 M NaCl, were added to 100 µL of 10 mg/mL azocasein, dissolved in 50 mM Tris 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8.0. After 60 min of incubation at 37 °C, the reaction was stopped by adding 200 µL of 5% trichloroacetic acid. The mixture was centrifuged and 150 µL of the supernatant was added to 150 µL of 0.5 M NaOH. Absorbances were recorded at 450 nm. The absorbances of samples corresponding to azocasein solutions incubated with 0.15 M NaCl were subtracted from the absorbances of venom-containing samples. One unit of proteolytic activity was defined as a change of 0.2 in absorbance per min.

#### 5.10. Gelatinolytic Activity

Gelatin zymography was performed in 12% SDS-PAGE gels containing 1 mg/mL gelatin (Bio-Rad, Carlsbad, CA, USA) for all 25 samples. The venoms (10 µg) were solubilized (5:1 venom/buffer) in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% SDS, 10% glycerol, and 0.002% bromophenol blue) in the absence of β-mercaptoethanol and without boiling. After electrophoresis at 120 V, the gels were placed sequentially in renaturing buffer (5% Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl, pH 8) for 2 h and developing buffer (0.1 M Tris-HCl, pH 8) for 10 min. Gels were then incubated in developing buffer at 37 °C for 12 h with gentle agitation. Gels were stained with staining solution (0.2% Coomassie brilliant blue R-250, 10% acetic acid, and 25% methanol) and destained with 10% acetic acid plus 10% methanol. Standard molecular mass markers (Bio-Rad, Carlsbad, CA, USA) were used as references [46,48].

### 5.11. Minimum Coagulant Dose Plasma (MCD-P)

For all samples, various amounts of venom (from 10 µg to 400 µg), dissolved in 100 µL 0.15 M NaCl, was added to 200 µL of citrated human plasma, previously incubated at 37 °C. Clotting times were recorded and coagulant activity was expressed as the Minimum Coagulant Dose in plasma (MCD-P) defined as the dose of venom inducing clotting in 60 s [84]. As a negative control, 100 µL of 0.15 M NaCl without venom was added to citrated human plasma.

### 5.12. Fibrinogenolytic Activity

Fibrinogenolytic activity of the venoms was tested using the procedure described by Borja et al. [46]. Human fibrinogen (150 µg; Sigma, St. Louis, MO, USA) was incubated with 24 individual venoms (5 µg) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, at 37 °C for 15 min. The reaction was stopped by adding reducing SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% SDS, 10% glycerol, 0.002% bromophenol blue, and 5% β-mercaptoethanol) and heating to 100 °C for 5 min. Fibrinogenolytic activity was demonstrated by 12% SDS-PAGE. As a negative control, human fibrinogen without venom was added to gels. Standard molecular mass markers (Bio-Rad, Carlsbad, CA, USA) were used as references.

### 5.13. Enzymatic Inhibition Analysis

To evaluate the influence of SVMPs in proteolytic activities over HPA, azocasein, gelatin, and human plasma, venoms were preincubated with 20 mM EDTA for 30 min at 37 °C before carrying out the analyses [40]. Similarly, coagulant activity over human plasma was carried out after preincubating venoms with 5 mM PMSF (inhibitor of serine proteases) for 15 min at 37 °C [85]. A concentrated stock of PSMF (167 mM) was prepared in 100% isopropanol. Then 3 µL of inhibitor (167 mM) were added to 97 µL of PBS containing venom samples and incubated for 10 min before being added to human plasma. A control of 3 µL of 100% isopropanol without inhibitor was used to demonstrate that isopropanol itself does not inhibit enzyme activity.

### 5.14. Median Lethal Dose (LD<sub>50</sub>)

Nine representative venoms were dissolved in phosphate buffer solution (PBS), pH 7.2. The lethal dose was determined by injecting different quantities of venom (from 10 µg to 150 µg) diluted in a total volume of 0.5 mL into the caudal vein of male and female ICR-CD1 mice (18 to 20 g) in groups of three [86]. The percentage of dead mice 24 h after inoculation was plotted against the logarithm of the quantity of venom injected and analyzed with nonparametric methods using the program GraphPad Prism V4 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, 2005) to determine the LD<sub>50</sub> value for each venom.

### 5.15. Minimum Hemorrhagic Dose (MHD)

Different quantities of eight representative venoms (from 5 µg to 25 µg) were injected intradermally, in a volume of 50 µL PBS, to groups of three (male and female) ICR-CD1 mice (25–28 g); 3 h later, they were sacrificed by CO<sub>2</sub>, their skin removed, and the area of the hemorrhagic spot was measured. The minimum hemorrhagic dose was defined as the dose of venom which induced a lesion of 10 mm diameter [87].

### 5.16. Detection of Crotoxin-Like Neurotoxins at the Protein Level

Detection of crotoxin-like neurotoxins was carried out using the procedure previously described to detect neurotoxins in *C. s. scutulatus* venoms [33]. Venom from two Mojave Rattlesnakes with Type A and Type B venom from Arizona were used as control.

### 5.17. Neutralization Studies

Neutralization studies were carried out using a modification of the procedure described by Gutierrez et al. [88]. Venoms of four *C. m. nigrescens* individuals with different TBL (CM06, CM09, CM18 and CM19) were challenged against two Mexican antivenoms: Antivipmyn<sup>®</sup> manufactured by Bioclon (Lot. B-9F-22) and Faboterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup> manufactured by Birmex (Lot. FV030A). Amounts equivalent to 3 times the LD<sub>50</sub> of each venom were incubated with different volumes of each antivenom (from 50 µL to 450 µL of antivenom) dissolved in PBS in a constant final volume of 500 µL for 30 min at 37 °C. Next, 500 µL of solution containing venom/antivenom were i.v. injected in groups of three (male and female) ICR-CD1 mice (18 to 20 g) and the survival percentage 24 h after inoculation was recorded. As controls, groups of three mice were injected with venom alone (positive) or antivenom alone (negative). Neutralization was expressed as Effective Dose 50% (ED<sub>50</sub>), the volume of antivenom that prevents the death of half of the injected population [81].

### 5.18. Immune Recognition of Antivenom

To observe the immune recognition of both Mexican antivenoms (Antivipmyn<sup>®</sup> and Faboterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup>) towards the components of eight representative *C. m. nigrescens* venoms (CM03, CM04, CM06, CM08, CM09, CM15, CM18, CM19), 10 µg of whole venom was separated by 15% SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-blot 0.45 µm, Bio-Rad, Merck, Cork, Ireland) using a model HEP-1<sup>®</sup> semi-dry immunotransference chamber (Thermo Scientific). After transference at 420 mA for 1 h, the membrane was blocked with 5% non-fat dry milk diluted in TBST buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20, pH 8.4) for 2 h. The membrane was then rinsed three times with TBST and incubated by shaking gently for 1 h at room temperature with Antivipmyn<sup>®</sup> or Favoterapico polivalente antiviperino<sup>®</sup> diluted 1:800 in TBST. After three washes with TBST, the membrane was incubated at room temperature for 1 h with goat antibodies against house IgG conjugated to alkaline phosphatase (Jackson Immuno Reserach) diluted 1:7000. The membrane was again rinsed with TBST and then developed by adding the BCIP/NPT substrate for alkaline phosphatase (Sigma<sup>®</sup>).

### 5.19. Statistical Analysis

The SigmaPlot<sup>®</sup>11 (Systat Software Inc. (SSI), San Jose, CA, USA, 2008) statistical program was used to determine the regression that best fit our data. We regressed the relative abundance of myotoxins, SVSP, and SVMPS in the venom to the total body length of the snake and evaluated the fit with linear curves. The relationship of proteolytic activity of venoms to snake total body length was assessed by sigmoidal curves. Differences in LD<sub>50</sub> between snakes with a TBL less than and greater than 70 cm were compared by using the Mann-Whitney *U* test.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6651/10/12/501/s1>, Figure S1. Reverse-phase HPLC chromatograms of remaining *C. m. nigrescens* venoms of snakes with different total body length (TBL). An analytic C18 reverse-phase column (Vydac<sup>®</sup>, Deerfield, IL, USA, 218 TP 4.6 mm × 250 mm) was used. Retention time is along the x axis for each panel and labeled every twenty min. Proteins were detected at 215 nm and absorbance is indicated on the left axis. The acetonitrile gradient is shown in the HPLC graph and the percentage value corresponds to the right axis for each panel. The regions where crotoamine-like myotoxins (Myo), snake venom serine proteases (SVSPs), and snake venom metalloproteinases (SVMPS) elute are illustrated in blue, green and red, respectively. Figure S2. Mass spectrometry of crotoamine-like myotoxins. RP-HPLC fractions 6 (A), 7 (B), 8 (C), 9 (D) and 10 (E) obtained from CM04 venom were analyzed using ESI-MS on an LCQ Fleet Ion Trap Mass Spectrometer. Molecular masses calculated were 5129 Da (A), 5071 Da (A), 5143 Da (B), 5180 Da (B), 4958 Da (C), 5143 Da (D), and 5082 Da (E).

**Author Contributions:** M.B., E.N.-C. and A.A. conceived and designed the experiments; M.B., G.C.-G., J.L.S., E.F.-M. and C.L.P. carried out field work and sampling; M.B., E.N.-C., R.P.-L. and E.F.-M. performed the experiments; M.B., E.N.-C., G.C.-G., J.L.S., J.E.-F., A.A., R.P.-M. and J.E.-F. analyzed the data. R.P.-M., A.A., G.C.-G., C.L.P., J.E.-F. and J.S.-M. contributed reagents, materials, analysis tools and/or funding; M.B., E.N.-C., G.C.-G., J.L.S. and A.A. wrote the paper; all authors edited and approved the final submission.

**Funding:** This research was funded by Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Durango (COCYTED) grant number COCYTED 2018 01: 15088 and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) grant number DGAPA-PAPIIT: IN207218.

**Acknowledgments:** We would like to thank Juan Castañeda, Melisa Bernard, Alejandro Olvera, Flavio C. García, Cristobal Moreno, Alan Salas, Fernando Hernandez, Manuel Rodriguez, Sara Valenzuela, Jorge Becerra, Leonardo Badillo, Jesus Sigala, Ricardo Ramirez, Raul Solis, Ivan Villalobos, Gustavo Quintero, Gustavo Zavala, Ivan Ahumada, Erick Rivas, Arely Gutierrez, Jason Jones, Chris Grünwald, Hector Franz, Eduardo Fanti, and Andrew Mason for their help in the field and laboratory. We thank Bruno Rodriguez for assistance making the maps for this manuscript. We thank Fernando Zamudio for his help with determining the masses of and doing the N-terminal sequencing for crotamine-like myotoxins. We thank Rhett Rautsaw and Claudia Avitia for making suggestions that improved this manuscript. In addition, we would like to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for supporting the scholarship grant to the postgraduate student M.B. (No. 247437), the National Science Foundation to C.L.P (DEB 1638879 and DEB 1822417), Clemson University through faculty startup to C.L.P, Prairie Biotic Research Inc. (J.L.S.), Sigma Xi Grants-in-aid-of-research (J.L.S.), SnakeDays Research Grant (J.L.S.), the Theodore Roosevelt Memorial Fund through the American Museum of Natural History (J.L.S.) and the Howard McCarley Student Research Award of the Southwestern Association of Naturalist (M.B. and J.L.S). We thank the Universidad Juarez del Estado de Durango for provided facilities and vehicles.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

## References

- Booth, C.L. Evolutionary significance of ontogenetic colour change in animals. *Biol. J. Linn. Soc.* **1990**, *40*, 125–163. [[CrossRef](#)]
- Lind, A.J.; Welsh, H.H.J. Ontogenetic changes in foraging behaviour and habitat use by the Oregon garter snake, *Thamnophis atratus hydrophilus*. *Anim. Behav.* **1994**, *48*, 1261–1273. [[CrossRef](#)]
- Brodin, T.; Johansson, F. Conflicting selection pressures on the growth/predation risk trade-off in a damselfly. *Ecology* **2004**, *85*, 2927–2932. [[CrossRef](#)]
- Natusch, D.J.D.; Lyons, J.A. Relationships between ontogenetic changes in prey selection, head shape, sexual maturity, and colour in an Australasian python (*Morelia viridis*). *Biol. J. Linn. Soc.* **2012**, *107*, 269–276. [[CrossRef](#)]
- Herrel, A.; Joachim, R.; Vanhooydonck, B.; Irschick, D.J. Ecological consequences of ontogenetic changes in head shape and bite performance in the Jamaican lizard *Anolis lineatopus*. *Biol. J. Linn. Soc.* **2006**, *89*, 443–454. [[CrossRef](#)]
- Webber, M.M.; Jezkova, T.; Rodríguez-Robles, J.A. Feeding Ecology of Sidewinder Rattlesnakes, *Crotalus cerastes* (Viperidae). *Herpetologica* **2016**, *72*, 324–330. [[CrossRef](#)]
- Holycross, A.T.; Mackessy, S.P. Variation in the diet of *Sistrurus catenatus* (Massasauga), with emphasis on *Sistrurus catenatus edwardsii* (Desert Massasauga). *J. Herpetol.* **2002**, *36*, 454–464. [[CrossRef](#)]
- Rulon, W.C. Diet of the Timber Rattlesnake, *Crotalus horridus*. *J. Herpetol.* **2002**, *36*, 494–499.
- Macartney, J.M. The Ecology of the Northern Pacific Rattlesnake, *Crotalus Viridis* Oregonus. Master's Thesis, University of Victoria, Victoria, BC, Canada, 1985.
- King, R.B. Predicted and observed maximum prey size—Snake size allometry. *Funct. Ecol.* **2002**, *16*, 766–772. [[CrossRef](#)]
- Daltry, J.C.; Wüster, W.; Thorpe, R.S. Diet and snake venom evolution. *Nature* **1996**, *379*, 537–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cipriani, V.; Debono, J.; Goldenberg, J.; Jackson, T.N.W.; Arbuckle, K.; Dobson, J.; Koludarov, I.; Li, B.; Hay, C.; Dunstan, N.; et al. Correlation between ontogenetic dietary shifts and venom variation in Australian brown snakes (*Pseudonaja*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *197*, 53–60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zelanis, A.; Tashima, A.K.; Rocha, M.M.T.; Furtado, M.F.; Camargo, A.C.M.; Ho, P.L.; Serrano, S.M.T. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 2278–2291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mackessy, S.P.; Williams, K.; Ashton, K.G. Ontogenetic Variation in Venom Composition and Diet of *Crotalus oregonus concolor*: A Case of Venom Paedomorphosis? *Copeia* **2003**, *4*, 769–782. [[CrossRef](#)]



15. Margres, M.J.; Wray, K.P.; Seavy, M.; McGivern, J.J.; Sanader, D.; Rokyta, D.R. Phenotypic integration in the feeding system of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *Mol. Ecol.* **2015**, *24*, 3405–3420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Reid, H.A.; Theakston, R.D.G. Changes in coagulation effects by venoms of *Crotalus atrox* as snakes age. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1978**, *27*, 1053–1057. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Saravia, P.; Rojas, E.; Arce, V.; Guevara, C.; López, J.C.; Chaves, E.; Velásquez, R.; Rojas, G.; Gutiérrez, J.M. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: Pathophysiological and therapeutic implications. *Rev. Biol. Trop.* **2002**, *50*, 337–346. [[PubMed](#)]
18. Céspedes, N.; Castro, F.; Jiménez, E.; Montealegre, L.; Castellanos, A.; Cañas, C.; Arévalo-Herrera, M.; Herrera, S. Biochemical comparison of venoms from young Colombian *Crotalus durissus cumanensis* and their parents. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2010**, *16*, 268–284. [[CrossRef](#)]
19. Mackessy, S.P. Venom ontogeny in the pacific rattlesnake *Crotalus viridis helleri* and *C. v. oreganus*. *Copeia* **1988**, *1*, 92–100. [[CrossRef](#)]
20. Rokyta, D.R.; Margres, M.J.; Ward, M.J.; Sanchez, E.E. The genetics of venom ontogeny in the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). *PeerJ* **2017**, *5*, e3249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mackessy, S.; Leroy, J.; Mociño-Deloya, E.; Setser, K.; Bryson, R.; Saviola, A. Venom Ontogeny in the Mexican Lance-Headed Rattlesnake (*Crotalus polystictus*). *Toxins* **2018**, *10*, 271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Neri-Castro, E.; Ponce-Lopez, R. Variación ontogénica en el veneno de *Crotalus simus* en México. *Aridociencia* **2018**, *3*, 42–47.
23. Calvete, J.J.; Sanz, L.; Cid, P.; de la Torre, P.; Flores-Díaz, M.; Dos Santos, M.C.; Borges, A.; Bremo, A.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; et al. Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 528–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Farstad, D.; Thomas, T.; Chow, T.; Bush, S.; Stiegler, P. Mojave rattlesnake envenomation in southern California: a review of suspected cases. *Wilderness Environ. Med.* **1997**, *8*, 89–93. [[CrossRef](#)]
25. Massey, D.J.; Calvete, J.J.; Sánchez, E.E.; Sanz, L.; Richards, K.; Curtis, R.; Boesen, K. Venom variability and envenoming severity outcomes of the *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mojave rattlesnake) from Southern Arizona. *J. Proteom.* **2012**, *75*, 2576–2587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Minton, S.A.; Weinstein, S.A. Geographic and ontogenic variation in venom of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*). *Toxicon* **1986**, *24*, 71–80. [[CrossRef](#)]
27. Kang, T.S.; Georgieva, D.; Genov, N.; Murakami, M.T.; Sinha, M.; Kumar, R.P.; Kaur, P.; Kumar, S.; Dey, S.; Sharma, S.; et al. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS J.* **2011**, *278*, 4544–4576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Hayes, W.K.; Herbert, S.S.; Reiling, G.C.; Gennaro, J.F. Factors that influence venom expenditure in viperids and other snake species during predatory and defensive contexts. In *Biology of the Vipers*; Schuett, G.W., Hoggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W., Eds.; Eagle Mountain Pub Lc: Eagle Mountain, UT, USA, 2002; pp. 207–233. [[CrossRef](#)]
29. Wu, C.H.; Huang, H.; Yeh, L.S.L.; Barker, W.C. Protein family classification and functional annotation. *Comput. Biol. Chem.* **2003**, *27*, 37–47. [[CrossRef](#)]
30. Tasoulis, T.; Isbister, G. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins* **2017**, *9*, 290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Sunagar, K.; Undheim, E.A.B.; Scheib, H.; Gren, E.C.K.; Cochran, C.; Person, C.E.; Koludarov, I.; Kelln, W.; Hayes, W.K.; King, G.F.; et al. Intraspecific venom variation in the medically significant Southern Pacific Rattlesnake (*Crotalus oreganus helleri*): Biodiscovery, clinical and evolutionary implications. *J. Proteom.* **2014**, *99*, 68–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Alape-Girón, A.; Sanz, L.; Escolano, J.; Flores-Díaz, M.; Madrigal, M.; Sasa, M.; Calvete, J.J. Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3556–3571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Borja, M.; Neri-Castro, E.; Castañeda-Gaytán, G.; Strickland, J.L.; Parkinson, C.L.; Castañeda-Gaytán, J.; Ponce-López, R.; Lomonte, B.; Olvera-Rodríguez, A.; Alagón, A.; Pérez-Morales, R. Biological and proteolytic variation in the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* from Mexico. *Toxins* **2018**, *10*, 35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Strickland, J.L.; Mason, A.J.; Rokyta, D.R.; Parkinson, C.L. Phenotypic variation in Mojave Rattlesnake (*Crotalus scutulatus*) venom is driven by four toxin families. *Toxins* **2018**, *10*, 135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Segura, Á.; Herrera, M.; Villalta, M.; Vargas, M.; Uscanga-Reynell, A.; de León-Rosales, S.P.; Jiménez-Corona, M.E.; Reta-Mares, J.F.; Gutiérrez, J.M.; León, G. Venom of *Bothrops asper* from Mexico and Costa Rica: Intraspecific variation and cross-neutralization by antivenoms. *Toxicon* **2012**, *59*, 158–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Zelanis, A.; Travaglia-Cardoso, S.R.; De Fátima Domingues Furtado, M. Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. *S. Am. J. Herpetol.* **2008**, *3*, 43–50. [[CrossRef](#)]
37. Saldarriaga, M.M.; Otero, R.; Núñez, V.; Toro, M.F.; Díaz, A.; Gutiérrez, J.M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* **2003**, *42*, 405–411. [[CrossRef](#)]
38. Menezes, M.C.; Furtado, M.F.; Travaglia-Cardoso, S.R.; Camargo, A.C.M.; Serrano, S.M.T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* **2006**, *47*, 304–312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Furtado, M.F.D.; Travaglia-Cardoso, S.R.; Rocha, M.M.T. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicon* **2006**, *48*, 401–410. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Dagda, R.K.; Gasanov, S.; De La Oiii, Y.; Rael, E.D.; Lieb, C.S. Genetic basis for variation of metalloproteinase-associated biochemical activity in venom of the Mojave rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*). *Biochem. Res. Int.* **2013**, *2013*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Whittington, A.C.; Mason, A.J.; Rokyta, D.R. A Single Mutation Unlocks Cascading Exaptations in the Origin of a Potent Pitviper Neurotoxin. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *35*, 887–898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Dowell, N.L.; Giorgianni, M.W.; Kassner, V.A.; Selegue, J.E.; Sanchez, E.E.; Carroll, S.B. The Deep Origin and Recent Loss of Venom Toxin Genes in Rattlesnakes. *Curr. Biol.* **2016**, *26*, 2434–2445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Dowell, N.L.; Giorgianni, M.W.; Griffin, S.; Kassner, V.A.; Selegue, J.E.; Sanchez, E.E.; Carroll, S.B. Extremely Divergent Haplotypes in Two Toxin Gene Complexes Encode Alternative Venom Types within Rattlesnake Species. *Curr. Biol.* **2018**, *28*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Casewell, N.R.; Wagstaff, S.C.; Wuster, W.; Cook, D.A.N.; Bolton, F.M.S.; King, S.I.; Pla, D.; Sanz, L.; Calvete, J.J.; Harrison, R.A. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 9205–9210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. García, L.T.; Parreiras, E.; Silva, L.T.; Ramos, O.H.P.; Carmona, A.K.; Bersanetti, P.A.; Selistre-De-Araujo, H.S. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2004**, *138*, 23–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Borja, M.; Lazcano, D.; Martínez-Romero, G.; Morlett, J.; Sánchez, E.; Cepeda-Nieto, A.C.; Garza-García, Y.; Zugasti-Cruz, A. Intra-specific variation in the protein composition and proteolytic activity of venom of *Crotalus lepidus morulus* from the Northeast of Mexico. *Copeia* **2013**, *4*, 707–716. [[CrossRef](#)]
47. Castro, E.N.; Lomonte, B.; del Carmen Gutiérrez, M.; Alagón, A.; Gutiérrez, J.M. Intraspecific variation in the venom of the rattlesnake *Crotalus simus* from Mexico: Different expression of crotoxin results in highly variable toxicity in the venoms of three subspecies. *J. Proteom.* **2013**, *87*, 103–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Borja, M.; Castañeda, G.; Espinosa, J.; Neri, E.; Carbajal, A.; Clement, H.; García, O.; Alagon, A. Mojave Rattlesnake (*Crotalus scutulatus scutulatus*) with Type B Venom from Mexico. *Copeia* **2014**, *1*, 7–13. [[CrossRef](#)]
49. Durban, J.; Sanz, L.; Trevisan-Silva, D.; Neri-Castro, E.; Alagón, A.; Calvete, J.J. Integrated venomomics and venom gland transcriptome analysis of juvenile and adult Mexican rattlesnakes *Crotalus simus*, *C. tzabcan*, and *C. culminatus* revealed miRNA-modulated ontogenetic shifts. *J. Proteome Res.* **2017**, *16*, 3370–3390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Hofmann, E.P.; Rautsaw, R.M.; Strickland, J.L.; Holding, M.L.; Hogan, M.P.; Mason, A.J.; Rokyta, D.R.; Parkinson, C.L. Comparative venom-gland transcriptomics and venom proteomics of four Sidewinder Rattlesnake (*Crotalus cerastes*) lineages reveal little differential expression despite individual variation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 15534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Goldberg, S.R. Reproduction in the Blacktail Rattlesnake, *Crotalus molossus* (Serpentes: Viperidae). *Tex. J. Sci.* **1999**, *5*, 323–328.
52. Platt, S.G.; Rainwater, T.R. A new maximum size record for *Crotalus molossus* (Baird and Girard, 1853). *J. Kansas Herpetol.* **2008**, *28*, 14–15.
53. Ernst, C.H.; Ernst, E.M. *Venomous Reptiles of the United States, Canada, and northern Mexico*; Johns Hopkins University Press: Baltimore, MD, USA, 2011; Volume 2, ISBN 0801898765.

54. Balderas-Valdivia, C.J.; Barreto-Oble, D.; Madrid-Sotelo, C.A. Contribución a la historia natural de *Crotalus molossus*. *Biodivers. del Pedregal San Ángel* **2009**, *363–369*.
55. Werler, J.E.; Dixon, J.R. *Texas Snakes: Identification, Distribution, and Natural History*; University of Texas Press: Austin, TX, USA, 2000; ISBN 9780292791305.
56. Ramírez, G.A.; Fletcher, P.L.; Possani, L.D. Characterization of the venom from *Crotalus molossus nigrescens* Gloyd (Black tail rattlesnake): Isolation of two proteases. *Toxicon* **1990**, *28*, 285–297.
57. Bober, M.A.; Glenn, J.L.; Straight, R.C.; Ownby, C.L. Detection of myotoxin a-like proteins in various snake venoms. *Toxicon* **1988**, *26*, 665–673. [[CrossRef](#)]
58. Rael, E.D.; Rivas, J.Z.; Chen, T.; Maddux, N.; Huizar, E.; Lieb, C.S. Differences in fibrinolysis and complement inactivation by venom from different northern blacktailed rattlesnakes (*Crotalus molossus molossus*). *Toxicon* **1997**, *35*, 505–513. [[CrossRef](#)]
59. Hardy, D.L.; Jeter, M.; Corrigan, J.J. Envenomation by the northern blacktail rattlesnake (*Crotalus molossus molossus*): report of two cases and the vitro effects of the venom on fibrinolysis and platelet aggregation. *Toxicon* **1982**, *20*, 487–493. [[CrossRef](#)]
60. Yarema, M.C.; Curry, S.C. Envenomation by the Northern Blacktail rattlesnake (*Crotalus molossus molossus*): Case report. *Pediatr. Emerg. Care* **2005**, *21*, 40–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Hardy, D.L.; Zamudio, K.R. Compartment syndrome, fasciotomy, and neuropathy after a rattlesnake envenomation: aspects of monitoring and diagnosis. *Wilderness Environ. Med.* **2006**, *17*, 36–40. [[CrossRef](#)]
62. Rael, E.D.; Salo, R.J.; Zepeda, H. Monoclonal antibodies to Mojave toxin and use for isolation of cross-reacting proteins in *Crotalus* venoms. *Toxicon* **1986**, *24*, 661–668. [[CrossRef](#)]
63. Wooldridge, B.J.; Pineda, G.; Banuelas-Ornelas, J.J.; Dagda, R.K.; Gasanov, S.E.; Rael, E.D.; Lieb, C.S. Mojave rattlesnakes (*Crotalus scutulatus scutulatus*) lacking the acidic subunit DNA sequence lack Mojave toxin in their venom. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *130*, 169–179. [[CrossRef](#)]
64. Chippaux, J.P.; Williams, V.; White, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon* **1991**, *29*, 1279–1303. [[CrossRef](#)]
65. Wray, K.P.; Margres, M.J.; Seavy, M.; Rokyta, D.R. Early significant ontogenetic changes in snake venoms. *Toxicon* **2015**, *96*, 74–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Goncalves, J.M.; Polson, A. The electrophoretic analysis of snake venoms. *Arch. Biochem.* **1947**, *13*, 253–259. [[PubMed](#)]
67. Oguiura, N.; Boni-Mitake, M.; Rádis-Baptista, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. *Toxicon* **2005**, *46*, 363–370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Kerkis, I.; Hayashi, M.A.F.; Prieto Da Silva, A.R.B.; Pereira, A.; De Sá Júnior, P.L.; Zaharenko, A.J.; Rádis-Baptista, G.; Kerkis, A.; Yamane, T. State of the art in the studies on crotamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Lourenço, A.; Zorzella Creste, C.F.; Curtolo de Barros, L.; Delazari dos Santos, L.; Pimenta, D.C.; Barraviera, B.; Ferreira, R.S. Individual venom profiling of *Crotalus durissus terrificus* specimens from a geographically limited region: Crotamine assessment and captivity evaluation on the biological activities. *Toxicon* **2013**, *69*, 75–81. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Ownby, C.L. Structure, function and biochemical aspects of the myotoxin from snake venoms. *Toxicon* **1998**, *17*, 213–238.
71. Saviola, A.J.; Pla, D.; Sanz, L.; Castoe, T.A.; Calvete, J.J.; Mackessy, S.P. Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab®. *J. Proteom.* **2015**, *121*, 28–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Castro, H.C.; Zingali, R.B.; Albuquerque, M.G.; Pujol-Luz, M.; Rodrigues, C.R. Snake venom thrombin-like enzymes: From reptilase to now. *Cell Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 843–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Swenson, S.; Markland, F.S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* **2005**, *45*, 1021–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Markland, F.S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. On behalf of the Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb. Haemost.* **1998**, *79*, 668–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Furtado, M.F.D.; Santos, M.C.; Kamiguti, A.S. Age-related biological activity of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* **2003**, *9*, 186–201. [[CrossRef](#)]
76. Mackessy, S.P. Venom composition in rattlesnakes: Trends and biological significance. In *The Biology of the Rattlesnakes*; Hayes, W.K., Beaman, K.R., Cardwell, M.D., Bush, S.P., Eds.; Loma Linda University Press: Loma Linda, CA, USA, 2008; pp. 495–510, ISBN 978-159410-011-6.
77. da Silva, N.J.; Aird, S.D.; Seebart, C.; Kaiser, I.I. A gyroxin analog from the venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *Toxicon* **1989**, *27*, 763–771. [[CrossRef](#)]
78. Phillips, D.; Swenson, S.D.; Markland, F.S., Jr. Thrombin-like snake venom serine proteinases. In *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles*; Mackessy, S.P., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2009; pp. 139–154, ISBN 9780849391651.
79. French, W.J.; Hayes, W.K.; Bush, S.P.; Cardwell, M.D.; Bader, J.O.; Rael, E.D. Mojave toxin in venom of *Crotalus helleri* (Southern Pacific Rattlesnake): Molecular and geographic characterization. *Toxicon* **2004**, *44*, 781–791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Glenn, J.L.; Straight, R.C.; Wolt, T.B. Regional variation in the presence of canebrake toxin in *Crotalus horridus* venom. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol.* **1994**, *107*, 337–346. [[CrossRef](#)]
81. Bénard-Valle, M.; Neri-Castro, E.; Fry, B.; Boyer, L. Antivenom research and development. In *Venomous Reptiles and Their Toxins*; Fry, B.G., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, 2015; pp. 61–72, ISBN 978-0-19-930939-9.
82. Chaves, F.; Gutiérrez, J.; Brenes, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). *Toxicon* **1992**, *30*, 1099–1109. [[CrossRef](#)]
83. Gutiérrez, J.M.; Sanz, L.; Flores-Díaz, M.; Figueroa, L.; Madrigal, M.; Herrera, M.; Villalta, M.; León, G.; Estrada, R.; Borges, A.; et al. Impact of regional variation in *Bothrops asper* snake venom on the design of antivenoms: Integrating antivenomics and neutralization approaches. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 564–577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Theakston, R.D.; Reid, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. *Bull. World Health Organ.* **1983**, *61*, 949–956. [[PubMed](#)]
85. Zaqueo, K.D.; Kayano, A.M.; Domingos, T.F.S.; Moura, L.A.; Fuly, A.L.; da Silva, S.L.; Acosta, G.; Oliveira, E.; Albericio, F.; Zanchi, F.B.; et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: Purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* **2016**, *195*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Lorke, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* **1983**, *54*, 275–287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Gutiérrez, J.M.; Gené, A.; Rojas, G.; Cerdas, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon* **1985**, *23*, 887–893. [[CrossRef](#)]
88. Gutiérrez, J.; Rojas, G.; Lomonte, B.; Gené, J.; Chaves, F.; Alvarado, J.; Rojas, E. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. *Toxicon* **1990**, *28*, 1127–1129. [[CrossRef](#)]





Este libro está dirigido a personal académico y especialistas comprometidos con temáticas de salud reproductiva, género y medio ambiente. También es de interés para aquellas personas dedicadas al estudio de contextos indígenas, rurales y migratorios que deseen indagar sobre los debates y diálogos interculturales entre quienes prestan servicios de salud reproductiva tradicionales y quienes lo hacen de manera institucional; asimismo, ofrece información para los estudiosos de las consecuencias de la exposición a ciertas sustancias químicas que afectan la salud reproductiva, especialmente a la menstruación, el embarazo y la lactancia. A partir de los estudios presentados se identificaron rezagos en la calidad y el acceso a la atención de la salud en ciertos grupos poblacionales, tal es el caso de las mujeres indígenas y campesinas.

En los diferentes capítulos se utilizan dos enfoques para analizar la salud, por un lado, uno socio-antropológico que discute la necesidad de generar diálogos interculturales entre quienes prestan servicios institucionales y tradicionales de salud reproductiva. Por otro lado, muestra, desde una perspectiva biomédica, que la exposición a ciertas sustancias químicas pone en riesgo la salud reproductiva de las mujeres y los hombres en determinados contextos medioambientales y geográficos. Para enmarcar ambos enfoques se consideró pertinente presentar un panorama de la política pública nacional en materia de salud y derechos reproductivos, por lo que el libro inicia con una descripción de los logros en la política pública en esos ámbitos entre 2000 y 2015.



Salud reproductiva,  
medio ambiente y género  
*Una diálogo necesario*

*Lourdes Camarena Ojinaga  
y 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*

© 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.



---

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
---------------------------	----------

*Lourdes Camarena Ojinaga y Adriana Leona Rosales Mendoza*

### **CAPÍTULO I**

<b>GÉNERO Y SEXUALIDAD. POLÍTICAS PÚBLICAS SOBRE LOS DERECHOS SEXUALES Y REPRODUCTIVOS EN MÉXICO (2000-2015).....</b>	<b>19</b>
---	-----------

*Margarita Elena Tapia Fonllem*

### **CAPÍTULO 2**

<b>X-ILAH K'OHA'AN (PARTERAS) Y PERSONAL MÉDICO ALÓPATA EN LA ATENCIÓN DEL EMBARAZO Y EL PARTO DE MUJERES MAYAS DE YUCATÁN Y QUINTANA ROO .....</b>	<b>55</b>
---	-----------

*Adriana Leona Rosales Mendoza*

### **CAPÍTULO 3**

<b>LA REPRODUCCIÓN ES UN ASUNTO DE PAREJA. EL TIEMPO PARA EMBARAZO COMO EVENTO CENTINELA Y SUS CONSIDERACIONES .....</b>	<b>77</b>
--	-----------

*Luz Helena Sanín Aguirre, Martha Elena Loya Loya,  
Dora Virginia Chávez Corral*

---

<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>CAPITULO 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>SEMBLANZA DE LAS AUTORAS .....</b>	<b>221</b>

---

## INTRODUCCIÓN

*Lourdes Camarena Ojinaga y Adriana Leona Rosales Mendoza*

Este libro está dirigido a especialistas y personal académico con interés en temáticas de salud reproductiva y su relación con el medio ambiente. Podría interesar a personas estudiosas de contextos indígenas, rurales y migratorios que deseen saber sobre la influencia de la intervención humana en el medio ambiente y sus consecuencias en distintos procesos de la salud reproductiva como la menstruación, el embarazo y la lactancia. Por otra parte, será útil para visualizar el diálogo intercultural que se establece (o no) entre prestadores de servicios institucionales de salud reproductiva y parteras rurales. Finalmente, permitirá conocer el marco legal de la política pública nacional en materia de salud y derechos reproductivos, en el periodo 2000-2015. El libro tiene como antecedente la confluencia de varias iniciativas, la primera fue en 2005 cuando se llevó a cabo el “I Taller Internacional de Salud Ambiental en América Latina: Desarrollando una Perspectiva de Género”, organizado por la Universidad de Michigan y El Colegio de Sonora, cuya sede fue la ciudad de Hermosillo, Sonora. El planteamiento central en ese taller fue impulsar la aplicación de la perspectiva de género en la investigación sobre salud y medio ambiente en América Latina, así como la creación de redes y grupos de trabajo para la investigación

y el desarrollo de programas de salud ambiental. Como resultado de ese encuentro se conformó la Red Internacional Género, Salud y Ambiente (RGSA), cuyo objetivo fue promover la reflexión y el diálogo sobre estas temáticas. Posteriormente, en 2006 la Universidad Autónoma de Chihuahua organizó el II Taller Internacional Género, Ambiente y Salud Reproductiva en la ciudad de Chihuahua; como producto de ese segundo encuentro se creó la Red de Cuerpos Académicos Salud, Trabajo y Ambiente con fines de investigación y docencia, la cual recibió apoyo de Fondos Mixtos de Conacyt para su fortalecimiento. Asimismo fue creado el proyecto editorial, con el objetivo de presentar experiencias de América Latina y el Caribe sobre género, salud y ambiente, en temas tales como la integración de aspectos metodológicos, el ambiente laboral y la relación entre ambiente y reproducción.

Posteriormente, se realizaron dos talleres internacionales más, el III Taller Internacional de Salud Ambiental en América Latina: Retos frente al Cambio Climático desde la Perspectiva de Género, el cual se efectuó en la ciudad de Medellín, Colombia, en 2009, y fue auspiciado por la Universidad de Antioquia. Los objetivos de esa reunión versaron sobre el diseño de una estrategia de trabajo de la Red a partir de la elaboración de perfiles de proyectos a desarrollar y así, establecer el plan de acción a largo y mediano plazos. El último taller fue organizado en 2010 en la ciudad de Ensenada, Baja California, bajo el patrocinio de la Universidad Autónoma de Baja California y el Cuerpo Académico Sociedad y Gobierno. En ese encuentro se intercambiaron conocimientos, vetas de investigación y retos para la política pública en el campo de la salud y el ambiente desde la perspectiva de género para las regiones fronterizas. La meta fue consolidar la Red de Género, Salud y Ambiente (RGSA), a partir de hallazgos y preocupaciones comunes en torno a dos ejes centrales: Frontera y Globalización: Nuevos escenarios en el marco de las relaciones de género.

Sobre los productos editoriales del ejercicio académico, hasta el momento se han publicado dos volúmenes, editados por la



Universidad Autónoma de Chihuahua en 2007 y 2011; el primero se tituló *Género, salud y ambiente: Un paso a la integración* en el que se subrayó la importancia de configurar un eje metodológico integrador y transdisciplinario de las diferentes áreas de conocimiento que permitiese una comprensión más completa de la realidad, y también impulsar la transformación de las problemáticas ambientales desde las relaciones de género. El segundo volumen: *Género, salud y ambiente laboral* se enfocó en la salud laboral, específicamente en los cambios producidos en las últimas décadas en ese ámbito. Se analizaron los nuevos riesgos que afrontan las y los trabajadores, las características del entorno laboral en el que se desenvuelven y las desfavorables condiciones de vida que enfrentan.

En septiembre de 2014, en la ciudad de Ensenada, Baja California, se llevó a cabo una reunión más de trabajo de la RGSA; entre los acuerdos tomados destacan: a) cambiar el nombre de la Red de Género, Salud y Ambiente por Grupo Internacional de Investigación Género, Salud y Ambiente (GIIGSA), cuyo objetivo es la reflexión y el diálogo para el estudio de la problemática de salud y ambiente, incluyendo una visión de género, y b) editar un tercer volumen con el tema de medio ambiente y salud reproductiva; texto que aquí presentamos.

En esta edición, la Universidad Pedagógica Nacional, Unidad Ajusco tiene un papel relevante, no solo porque este libro ha sido posible mediante un convenio con la Universidad Autónoma de Baja California, sino porque se han integrado académicas de la UPN a GIIGSA, con lo que el trabajo colegiado se verá favorecido. En ese sentido, los estudios realizados se tornan cada vez más transdisciplinarios y abarcan regiones geográficas cada vez más amplias.

Los capítulos de este libro se basan principalmente en dos enfoques disciplinarios: el biomédico y el socioantropológico, ya que consideramos que los procesos de la salud de las mujeres y de los hombres atraviesan tanto por la anatomía y la fisiología, como por aspectos sociales y antropológicos, ambos observables desde dimensiones demográficas. Por un lado, se describen ciertas

alteraciones en la salud reproductiva; información que se hallará en los textos que analizan problemáticas provocadas por agentes químicos utilizados en la agricultura. Por otro lado, se da cuenta sobre lo hecho desde la política pública en materia de salud y derechos reproductivos en este milenio, y se analiza la relación entre los servicios médicos tradicionales y los institucionales con miras a profundizar en los enfoques intercultural y de género sobre la salud de las mujeres, cuestiones que se abordan en los capítulos que tratan sobre políticas públicas, embarazo y parto. La intención es explorar en el futuro más aspectos de la salud, con otras perspectivas teóricas y metodológicas, y retomar el esfuerzo de GIIGSA por colocar la perspectiva de género en todas las investigaciones por realizar.

En la vinculación entre medio ambiente y salud reproductiva están implícitas problemáticas particulares que atañen a las mujeres o a los hombres, en ese sentido, es relevante tomar en cuenta el género, en su conceptualización clásica de construcción sociocultural de la diferencia sexual. Aunque la mayoría de los trabajos aquí presentados no incorporan cabalmente la perspectiva de género, es importante subrayar que las situaciones de salud de las personas que laboran en contextos agrícolas, y la de quienes prestan servicios en las áreas de salud reproductiva, se relacionan directamente con el sexo biológico con el que se ha nacido, o bien, con ciertas condiciones de género; por ejemplo, las parteras son casi siempre mujeres, lo que confiere un carácter particular a esta práctica cultural. Asimismo, cuando mujeres entran en contacto con pesticidas durante el desempeño de su trabajo como campesinas, tienen riesgo de sufrir alteraciones en los ciclos menstruales, el embarazo, el parto y la lactancia; a su vez, los varones también están expuestos a riesgos de experimentar bajos conteos espermáticos al someterse a los agentes químicos en el campo.

Es pertinente delimitar aquí qué se entiende por medio ambiente, así como por salud reproductiva. El medio ambiente se refiere al entorno físico natural y artificial en el que las personas nos desarrollamos e interactuamos con otros seres animados o inanimados;

está formado por la tierra, el agua, el aire, la flora y la fauna, en cuya existencia intervenimos seres humanos. En particular, es importante resaltar la influencia nociva de ciertos ambientes –como el agrícola con el uso de pesticidas– sobre la salud reproductiva, ya que esos químicos alteran los ciclos menstruales, se incorporan al feto durante el embarazo, y en la lactancia pasan de la madre al hijo o la hija.

La salud reproductiva fue definida en la Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo de El Cairo en 1994, en donde se estableció que consiste en

un estado de bienestar físico, mental y social, y no de mera ausencia de enfermedades o dolencias, en todos los aspectos relacionados con el sistema reproductivo y sus funciones y procesos (...) la salud reproductiva entraña la capacidad de disfrutar de una vida sexual satisfactoria y sin riesgos de procrear (...) (ONU, 1994: 37).<sup>1</sup>

En este sentido, el abordaje de la relación medio ambiente/salud reproductiva, da cuenta del estado de bienestar o malestar físico y social generado en un medio ambiente –alterado con fines tecnológicos– y que resulta nocivo para la salud reproductiva de mujeres y hombres.

Este libro, contiene ocho capítulos que se articulan en torno a problemáticas de la salud reproductiva y el medio ambiente, y que tienen como eje común a la reproducción biológica: menstruación, embarazo, parto, lactancia. En los textos se realiza una exploración del vínculo entre la exposición de las mujeres a productos químicos y su ciclo menstrual, en torno a la reproducción, la política pública sobre el tema, y un acercamiento a la discusión sobre la necesidad de propiciar diálogos interculturales entre el personal de los

---

<sup>1</sup> ONU, 1994, Informe de la Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo, El Cairo, 5-13 de septiembre de 1994. En: [https://www.unfpa.org/sites/default/files/event-pdf/icpd\\_spa\\_2.pdf](https://www.unfpa.org/sites/default/files/event-pdf/icpd_spa_2.pdf)

servicios de salud institucionales y el de contextos indígenas, como las parteras rurales.

El primer capítulo, *Género y sexualidad. Políticas públicas sobre los derechos sexuales y reproductivos en México (2000-2015)*, es presentado por Margarita Elena Tapia Fonllem, en él analiza el desarrollo de las políticas públicas en estos rubros de 2000 a agosto de 2015. Se centra en tres modalidades de políticas públicas elaboradas por las y los diversos tomadores de decisiones, tales como las leyes federales, las normas oficiales mexicanas (NOM)<sup>2</sup> y los programas de gobierno que buscan resolver problemáticas en estos ámbitos de la salud. Subraya la autora que aunque se realizaron importantes esfuerzos por parte de instancias gubernamentales para implementar políticas públicas dirigidas a atender la situación de mujeres y jóvenes de ambos sexos, en cuanto al ejercicio de sus derechos sexuales y reproductivos, no se obtuvieron los resultados esperados. Los embarazos en niñas y adolescentes han aumentado, la mortalidad materna y la prevalencia del VIH/sida siguen siendo graves problemas de salud pública, el personal de salud está mal capacitado y resulta insuficiente para atender a la población, además, hay carencia de infraestructura, equipo y camas hospitalarias. Para Tapia es relevante crear mecanismos evaluadores en los que participen expertas en salud reproductiva, género y derechos humanos, tanto de la sociedad civil organizada como de la comunidad académica, con miras a evaluar los avances logrados en los últimos años e identificar retos en materia de salud reproductiva, salud sexual y género.

Adriana Leona Rosales Mendoza presenta el texto *X-ilah k'oha'an (parteras) y personal médico alópata en la atención del embarazo y el parto de mujeres mayas de Yucatán y Quintana Roo*. La autora señala la necesidad de generar diálogos interculturales entre

---

<sup>2</sup> Las NOM son instrumentos metodológicos creados por el gobierno federal que permiten a las distintas dependencias gubernamentales establecer parámetros evaluables para evitar riesgos a la población, a los animales y al medio ambiente.



mujeres mayas, y las parteras con las y los médicos institucionales que brindan atención durante el embarazo y el parto; hace notar la necesidad de recuperar los saberes comunitarios sobre la salud reproductiva, específicamente de las parteras, quienes siguen atendiendo a muchas mujeres en las comunidades indígenas, entre ellas, mayas peninsulares. En su texto, Adriana Leona describe elementos de la práctica de partería, comenta sobre los intentos por institucionalizarla y los esfuerzos recientes para colocarla de nuevo en la agenda nacional de salud pública. Argumenta que si bien es necesario capacitar técnicamente a las parteras para mejorar la atención que brindan, es más importante identificar un modelo de profesionalización y legitimación de la práctica de la partería. Asimismo, enfatiza en el reconocimiento —como un derecho humano— a la remuneración que deberían recibir las parteras, al mismo tiempo que hace hincapié en la ausencia de reconocimiento a los saberes culturales que se ejercen en la práctica de la partería. Afirma la autora que hay que apuntar hacia principios rectores como la interculturalidad, el enfoque de derechos y la perspectiva de género en la sensibilización y capacitación dirigidas al personal institucional de salud, para lograr que sus acciones de atención médica en las comunidades rurales e indígenas tengan un impacto efectivo. Asimismo, señala Rosales, se requiere del diálogo entre practicantes de la medicina tradicional —parteras, curanderas, sobadoras— y el personal médico institucional, lo cual podría coadyuvar en la producción de propuestas de intervención para disminuir el embarazo temprano y la mortalidad materna. Con el reconocimiento y valoración de las parteras, se aprovecharía su liderazgo en la implementación de estrategias y programas de acción en el campo de la salud reproductiva.

En su texto *La reproducción es un asunto de pareja. El tiempo para embarazo como evento centinela y sus consideraciones*, Luz Helena Sanín Aguirre, Dora Virginia Chávez Corral y Martha Elena Loya Loya describen el proceso biológico de la gestación de manera amplia para luego discutir el concepto *tiempo para embarazo* (TPE o

TTP en inglés). Señalan que el TPE como indicador es muy preciso, útil y fácil de obtener en la ciencia médica, lo cual permite realizar vigilancia epidemiológica, identificar tendencias en el tiempo, ver variaciones espaciales y detectar factores de riesgo en el ámbito ocupacional o ambiental. El TPE se calcula en meses, es un indicador asequible para estudiar, con alta sensibilidad e inclusive fácil de obtener con una pregunta tan simple como: ¿cuánto tiempo le tomó a usted y a su pareja quedar embarazados? A partir de los años ochenta se propuso la exploración del TPE como indicador de la exposición a factores ambientales dañinos que pudieran estar asociados adversamente con la fertilidad, fecundidad y subfecundidad de hombres y mujeres. Las autoras concluyen que el TPE es poco invasivo, tiene buena sensibilidad, puede ser medido retrospectiva y prospectivamente. En ese sentido, es un método útil para medir el impacto del medio ambiente en la salud reproductiva.

Norma Elena Pérez Herrera, María Teresa Castillo Burguete y Mayra Vera Avilés en su texto *Salud Reproductiva en familias agrícolas yucatecas: modelo de abordaje mediante investigación-acción participativa* tratan el tema de la salud reproductiva y la exposición a plaguicidas, en agricultores y sus parejas, a partir de un estudio que vincula la investigación científica con la investigación-acción participativa. El problema que ubicaron es que los resultados de estudios sobre la influencia de plaguicidas en la salud humana –provenientes de la investigación médica– no se dan a conocer a la población; aun a sabiendas de que se han detectado daños en la salud de agricultores y sus familias. En ese sentido, las autoras consideran importante que la población conozca y participe de manera activa y reflexiva en la detección y atención de sus problemas de salud, así como en la búsqueda de soluciones. Consideran que el diálogo y el trabajo conjunto entre personas investigadoras y comunidad, a través de la acción participativa, es relevante; lo que demuestran con los resultados de su estudio, el cual, además de generar conocimiento, responde a las necesidades de comunidades específicas, teniendo en cuenta que hay que informarles los hallazgos obtenidos

e involucrarlas en la aplicación de medidas para la prevención de daños a la salud por la exposición a plaguicidas.

Leticia Yáñez Estrada, Andrea Rodríguez López, Rebeca Mejía Saucedo y Jaqueline Calderón Hernández en su texto *Estrategias para detectar alteraciones del ciclo menstrual en adolescentes de una comunidad agrícola de San Luis Potosí* presentan resultados de una investigación que buscó ubicar cambios en el ciclo menstrual de jóvenes en una población rural. Argumentan que los problemas derivados de la utilización de agentes químicos que inciden en la salud reproductiva de las mujeres, impactan más allá de los procesos fisiológicos, pues influyen en la vida, los planes y proyectos de las mujeres en términos de la maternidad. Plantean que la exposición a agroquímicos no es la única causa de las alteraciones registradas en el ciclo menstrual de las participantes, por lo que proponen otros estudios para evaluar la influencia del estrés, la ansiedad, la depresión y otras variables como el alcoholismo y la farmacodependencia. Finalmente, proponen desarrollar otros estudios desde la sociología o la antropología con perspectiva de género.

María Evarista Arellano García, Christine Von Glascoe, Lourdes Camarena y Concepción Martínez en su texto *Alteraciones del ciclo menstrual y estabilidad citogenética en mujeres jornaleras del valle de San Quintín* exploran posibles modificaciones en el ciclo menstrual, causadas por la exposición ambiental y laboral a plaguicidas, en mujeres jornaleras que residen y trabajan en el valle agrícola de San Quintín, Baja California. Las autoras conciben que, dentro de los tópicos de salud reproductiva, el ciclo menstrual es un tema a investigar en el que influyen la cultura y el momento histórico, los cuales pueden ser abordados desde una perspectiva biopsicosocial, cultural y antropológica. Para ellas, es relevante tomar en cuenta los derechos humanos y los aspectos medioambientales, subrayando el derecho a vivir una menarca y una menstruación con higiene, dignidad y libre de toda estigmatización. De acuerdo con las autoras, algunos estudios han abordado la relación entre el ciclo menstrual y ciertos residuos biológico-infecciosos cuyo efecto contaminante puede incidir

en alteraciones del ciclo menstrual o el acortamiento de la edad en que se presenta la menarca, entre otras consecuencias. Ciertos agroquímicos han sido señalados “como disruptores endócrinos con capacidad de provocar cambios en el ciclo menstrual, ya sea porque interfieren en la secreción de hormonas o porque estos compuestos mimetizan los efectos de los estrógenos”. Señalan las autoras que a pesar de la enorme relevancia social y económica del trabajo de estas mujeres, son pocos los estudios efectuados sobre los efectos causados por la exposición a plaguicidas en la salud de jornaleras, y menos aún sobre los efectos en su salud reproductiva. Por lo tanto, se dieron a la tarea de indagar el tema a partir de la implementación de una metodología mixta que combinó la aplicación de un cuestionario y una serie de pruebas de laboratorio que midieron la citotoxicidad y genotoxicidad presentes en muestras de células bucales en mujeres participantes. En los resultados, arrojados en la intervención con 32 mujeres en edad reproductiva, hallaron una asociación directa entre las molestias y alteraciones del ciclo menstrual con la exposición a los agroquímicos.

Lourdes Camarena, Concepción Martínez, Christine Von Glascoe y Evarista Arellano, en su capítulo *Continuidades y interrupciones en la salud sexual y reproductiva de mujeres indígenas en el valle de San Quintín* abordan desde una perspectiva sociocultural, algunos cambios y continuidades en los saberes y prácticas sobre sexualidad y salud reproductiva de mujeres indígenas migrantes que habitan en el valle de San Quintín, Baja California.

Argumentan las autoras que, en sociedades indígenas, tanto la sexualidad como la reproducción presentan una serie de características distintivas, ya que estos grupos poblacionales con frecuencia viven en pobreza, poseen grados de escolaridad menores a los de poblaciones no indígenas, y sus conocimientos sobre salud reproductiva, igualdad de género y sexualidad son insuficientes. Estas condiciones ubican a las comunidades indígenas en posiciones de desventaja y vulnerabilidad, particularmente a las mujeres, lo cual afecta sus procesos de salud reproductiva.

El texto *Impacto de los nitratos en la reproducción femenina* de Esperanza Yasmin Calleros Rincón y Rebeca Pérez Morales fija su atención en los problemas de fertilidad debido a la exposición a ciertas sustancias químicas que repercuten en la salud reproductiva de la pareja y afectan su capacidad de procreación. En el capítulo analizan los efectos de la contaminación por nitratos en agua de consumo humano y su impacto en la salud reproductiva de mujeres que viven en zonas rurales y agrícolas de Ciudad Lerdo, Durango. Señalan que los fertilizantes nitrogenados son la principal fuente de contaminación de los acuíferos poco profundos, de los cuales proviene la mayor parte del agua que bebe esa comunidad rural. Otra fuente de contaminación por nitratos se genera de los animales de crianza (bovinos, porcinos o aves) al producir grandes cantidades de excretas que generan nitrógeno y que eventualmente contaminan las aguas superficiales y profundas de la zona. Las autoras, subrayan que en el cuerpo humano el nitrato se transforma en nitrito, el cual reacciona con ciertos sustratos como aminas, amidas y aminoácidos para producir los compuestos nitrosos (NOC), que son algunos de los carcinógenos más potentes conocidos. Los resultados de esta investigación muestran que ciertas mujeres que consumieron agua contaminada por nitratos y viven en zonas de alta exposición a este químico, tardaron más tiempo en quedar embarazadas que las mujeres que viven en las zonas de media y baja exposición. Además, encontraron que en Durango, particularmente en la región lagunera, se utiliza agua contaminada en actividades de agricultura y ganadería, lo que contribuye al aumento de la problemática abordada.

En síntesis, este libro muestra resultados de diferentes investigaciones en el campo de la salud reproductiva y el medio ambiente, en los que se identifican rezagos en la calidad y acceso a la atención de grupos poblacionales, como es el caso de mujeres indígenas, trabajadoras agrícolas y en condición de migración. Las disparidades están relacionadas con variables de género, raza/etnia, escolaridad y clase social, de tal forma que para atender estas carencias es necesario plantear estrategias y acciones en salud reproductiva que partan de un enfoque de



derechos, con una visión intercultural y desde la perspectiva de género. En el diseño de políticas públicas es necesario tomar en cuenta los hallazgos de investigaciones que muestran que la exposición a ciertas sustancias químicas pone en riesgo la salud reproductiva. Sitios contaminados con plaguicidas, metales pesados, compuestos orgánicos u otros elementos tóxicos se ubican en diferentes escenarios como áreas agrícolas, agua subterránea, comunidades rurales e indígenas, entre otras. Las enfermedades pueden ser congénitas o hereditarias, pero también creadas por las acciones del ser humano sobre el medio ambiente natural. Las investigaciones sobre salud y medio ambiente deben tomar en cuenta distintas variables, definir nuevas áreas de estudio, considerar el trabajo transdisciplinario y, además, no solo estudiar los aspectos fisiológicos de la salud reproductiva de las mujeres y los hombres, sino analizar los datos desde la perspectiva de género. La tarea ha de realizarse en todas las actividades de investigación: en la búsqueda de fuentes bibliográficas y orientaciones teóricas, en la delimitación de un método para el trabajo de campo, en la planificación y en la presentación de los resultados.

Las integrantes del Grupo Internacional de Investigación Género, Salud y Ambiente (GIIGSA) sabemos que esta labor requiere de nuevos planteamientos epistemológicos, metodológicos y éticos, que resulten *útiles para* avanzar en la solución de problemáticas específicas, y que permitan analizar las diferencias sexo-genericas en las temáticas de salud y ambiente. Dos preguntas que nos planteamos son: ¿de qué manera los resultados de las investigaciones realizadas aportan a la generación de conocimientos para comprender mejor la realidad de la salud reproductiva?, y más importante aún, ¿estos hallazgos pueden conducir a cambios efectivos en términos de lograr mejores estrategias para la atención de la salud reproductiva? Estos cuestionamientos reflejan preocupaciones trascendentales en nuestro grupo, aunque tenemos claro que a pesar de los genuinos propósitos y esfuerzos de trabajo, aún hay tareas pendientes y retos por vencer, como es lograr la plena incorporación de la perspectiva de género en todas nuestras investigaciones.

---

CAPÍTULO I  
**GÉNERO Y SEXUALIDAD. POLÍTICAS PÚBLICAS  
SOBRE LOS DERECHOS SEXUALES Y REPRODUCTIVOS  
EN MÉXICO (2000-2015)**

*Margarita Elena Tapia Fonllem*

**INTRODUCCIÓN**

En el periodo comprendido entre los años 2000 y 2015 México experimentó importantes transformaciones en la creación de políticas públicas orientadas a propiciar mejores condiciones para las mujeres, tanto en materia legislativa, como en la creación de normas, reglamentos y programas de gobierno. Sin embargo, en los últimos años de dicho periodo se vivió la reacción de fuerzas conservadoras que promovieron el retroceso en los derechos sexuales y reproductivos, concretándose en el hecho de elevar a rango constitucional la vida desde la concepción y penalizar la interrupción del embarazo en 19 estados de la república.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Los estados son: Baja California, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Colima, Durango, Guanajuato, Jalisco, San Luis Potosí, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sonora, Yucatán, Tamaulipas y Veracruz.

El avance de políticas públicas para lograr la igualdad sustantiva entre mujeres y hombres fue un proceso de cambio que también ocurrió en numerosos países del mundo, producto de los diagnósticos, propuestas, plataformas de acción, conferencias y convenciones promovidas por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) durante las tres últimas décadas del siglo XX.

Por la importancia de este hecho es que se analizará el desarrollo de las políticas públicas en salud sexual y reproductiva realizadas en México en el periodo comprendido desde el año 2000 hasta agosto de 2015. El análisis se centra en tres modalidades de políticas públicas elaboradas por los diversos tomadores de decisiones, tales como las leyes federales, las normas oficiales mexicanas (NOM)<sup>2</sup> y los programas de gobierno que buscan contribuir a resolver los principales problemas relacionados con la salud sexual y reproductiva.

En México, como en varios países de América Latina, existe la tendencia a considerar los derechos sexuales y reproductivos como uno solo, por esa razón, los derechos sexuales quedan subsumidos en el conjunto de preceptos que conforman los derechos reproductivos como son el acceso a métodos anticonceptivos y el derecho a decidir libremente tener hijos o no, así como el número y su espaciamiento. Esta expresión homóloga de dos derechos diferentes trae como consecuencia que los derechos sexuales y reproductivos solo se dirijan a personas heterosexuales en edad reproductiva dejando de lado los derechos sexuales del resto de personas con identidades sexuales diferentes a la heterosexualidad, como son las lesbianas, homosexuales, bisexuales, transexuales y transgénero, así como a las personas consideradas de edad avanzada (Ávalos, 2013).

En este capítulo se parte de la premisa de que los derechos sexuales son derechos humanos relacionados con la sexualidad, mientras que la salud sexual va más allá de lo reproductivo, pues incluye la

---

<sup>2</sup> Las NOM son instrumentos metodológicos creados por el gobierno federal que permiten a las distintas dependencias gubernamentales establecer parámetros evaluables para evitar riesgos a la población, a los animales y al medio ambiente.

personalidad y la identidad sexual de cada ser humano, la afectividad, el amor, la privacidad, la autonomía para decidir sobre el cuerpo, la comunicación y las relaciones interpersonales. La sexualidad forma parte de las personas a lo largo de toda su vida y no solo en el momento reproductivo. La sexualidad también incluye el placer, el orgasmo, la masturbación, las relaciones sexuales seguras, libres de coerción, discriminación y violencia (OMS, 2006; IPPF, 2009; OREALC/UNESCO Santiago, 2014). Esta conceptualización de la sexualidad no está arraigada en la sociedad actual, en parte por la ausencia de dicha temática en el sistema educativo, además de la casi nula preparación de las familias mexicanas al respecto.

Una de las leyes de reciente creación en nuestro país, que aborda el tema de la sexualidad es la Ley General de los Derechos de Niñas, Niños y Adolescentes (LGNNA), decretada en 2014, cuya relevancia consiste no solo en su carácter nacional sino en su contenido, pues en varios de sus artículos establece claramente la necesidad de una educación sexual integral para la niñez y la adolescencia. Sin embargo, a pesar de su importancia, el Nuevo Modelo Educativo de la Secretaría de Educación Pública (SEP) de 2017 no la incluyó.

Ante este panorama de ausencia de educación sexual en el currículo, grupos de profesores y profesoras han desarrollado experiencias en algunos estados de la república, por ejemplo, retomando la materia de Educación Sexual, entre las opciones de materia estatal, en el nivel de secundaria. Son los casos de Michoacán, Ciudad de México y Veracruz a partir del año 2009 y hasta el 2011. Sin embargo, a pesar de lo valioso de dichas iniciativas, es el Estado mexicano el que debe garantizar la educación sexual en todos los niveles educativos.

Una de las principales causas que impiden al Estado mexicano incorporar el tema de la sexualidad en el currículo del sistema educativo, es la presión ejercida por representantes de la Iglesia católica y de las asociaciones de padres de familia. Muestra de ello es la férrea oposición de estos actores cuando en diversas ocasiones se ha tratado de incluir la sexualidad en los libros de texto gratuitos.

El matrimonio igualitario entre personas del mismo sexo es uno de los avances más significativos que se ha logrado en México en materia de derechos sexuales. Legalmente, existe el matrimonio igualitario en 11 entidades federativas.<sup>3</sup>

La Ciudad de México, antes Distrito Federal, fue pionera en este avance, con la aprobación de la otrora Ley de Sociedades de Convivencia en el año 2006. De la misma manera que lo fue al aprobar el derecho al aborto hasta las 12 semanas de gestación en el año 2007.

Ante estos logros en cuanto a derechos sexuales y reproductivos las fuerzas conservadoras siguieron ejerciendo presión, que queda manifiesta en la movilización masiva llevada a cabo a nivel nacional el 24 de septiembre de 2016, promovida por prelados de la Iglesia católica y por el Frente Nacional Pro Familia, en contra de la iniciativa del Ejecutivo de incorporar a la Constitución Política Mexicana el derecho al matrimonio civil entre personas del mismo sexo.

En dicha movilización se arremetió contra la ideología de género, bajo la consideración de que confunde y pervierte a las y los escolares con el discurso de la diversidad sexual y la identidad de género. La influencia de estos grupos de ideología conservadora va contra el principio de laicidad del Estado mexicano, obligatorio para la educación pública, y va también en contra de los derechos humanos de las personas.

En el periodo estudiado destaca el papel que desempeñó el Poder Judicial de la Federación para el avance de los derechos sexuales y reproductivos, pues integró como delito la violación entre cónyuges, en el año 2006, mientras que en 2008 confirmó el derecho de las mujeres a decidir sobre su vida reproductiva. En el mismo año determinó el libre derecho de las personas trans para solicitar el

---

<sup>3</sup> Nos referimos a: Baja California (Junio 2014), Coahuila (Sep. 2014), Nayarit (Dic. 2015), Jalisco (Enero 2016), Campeche, Colima y Michoacán (Mayo 2016), Morelos (Junio 2016), Chihuahua (Abril 2017), Quintana Roo (Mayo 2017) y Puebla (Agosto 2017).



cambio de su identidad en el registro civil, respetando el desarrollo de su personalidad y privacidad.

Además, el Poder Judicial de la Federación resolvió las reformas al Código Civil, del otrora Distrito Federal, en las que se reconoce a partir del año 2010 el matrimonio igualitario y su derecho a la adopción. Para 2013 amplió los derechos en la Ley del Seguro Social para el acceso del o la cónyuge de la persona asegurada, al seguro de enfermedades y a la maternidad, independientemente de que sean matrimonios o concubinos de distinto o del mismo sexo.

Finalmente, en 2015, declaró inconstitucional toda ley de cualquier entidad federativa que estipule que la finalidad del matrimonio es la procreación y/o que defina que se celebra solo entre un hombre y una mujer.

Las políticas públicas sobre derechos sexuales son insuficientes en México y solo existen en la modalidad de programas o componentes de leyes relacionadas con la igualdad, la no violencia y la no discriminación, o en leyes locales de algunos estados. La educación en sexualidad sigue siendo un vacío en el sistema educativo mexicano. Su inclusión en el currículo en todos los niveles de educación evitaría muchos de los problemas que la sociedad experimenta cotidianamente de violencia sexual, matrimonios forzados, embarazos adolescentes, muertes maternas, así como crímenes de odio contra mujeres y contra personas de la diversidad sexual, entre otros.

## CONTEXTO INTERNACIONAL Y NACIONAL EN DERECHOS SEXUALES Y REPRODUCTIVOS

A nivel internacional, el periodo estudiado estuvo marcado por los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM) en el año 2000. Los países miembros de la ONU, entre ellos México, se comprometieron a reducir en tres cuartas partes, entre 1990 y 2015, la mortalidad materna y a lograr el acceso universal de las mujeres a la *salud*

*reproductiva*,<sup>4</sup> así como a combatir el VIH/sida, por medio de acciones y programas de información masiva dirigidos, sobre todo, a la población joven.

Otro hecho internacional relevante en este periodo, fue la adopción en septiembre de 2015 de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible por parte de la Asamblea General de la ONU. Esta iniciativa surgió de los países miembros de ese organismo multilateral que consideraron la necesidad e importancia de elaborar una nueva agenda de desarrollo después de 2015, reconociendo el supuesto éxito de los Objetivos del Milenio. En la Conferencia sobre el Desarrollo Sostenible, Río + 20, de 2012, acordaron instalar un grupo de trabajo con el fin de elaborar una serie de objetivos para el desarrollo sostenible.

Este proceso fue abierto a la sociedad civil e involucró a representantes de los 193 Estados Miembros de la ONU y otros actores interesados en participar. A diferencia de los ODM que se elaboraron por un equipo de personas expertas a puerta cerrada y estaban dirigidos solo a países con economías emergentes, en especial a los más pobres, los Objetivos de Desarrollo Sostenible son para aplicarse tanto en los países pobres como en los ricos.

La Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible pretende exterminar la pobreza extrema, luchar contra la desigualdad y la injusticia y combatir el cambio climático. Para ello se elaboraron 17 objetivos de desarrollo con 169 metas.<sup>5</sup>

---

<sup>4</sup> Los ocho propósitos de los ODM son el único instrumento de la ONU que especifica plazos para su cumplimiento.

<sup>5</sup> Los objetivos son: 1 Fin de la pobreza, 2 Hambre cero, 3 Salud y bienestar, 4 Educación de calidad, 5 Igualdad de Género, 6 Agua limpia y saneamiento, 7 Energía asequible y no contaminante, 8 Trabajo decente y crecimiento económico, 9 Industria, innovación e infraestructura, 10 Reducción de las desigualdades, 11 Ciudades y comunidades sostenibles, 12 Producción y consumo responsables, 13 Acción por el clima, 14 Vida submarina, 15 Vida de ecosistemas terrestres, 16 Paz, justicia e instituciones sólidas, 17 Alianzas para lograr los objetivos. Ver en: <http://www.sela.org/media/2262361/agenda-2030-y-los-objetivos-de-desarrollo-sostenible.pdf>

El Objetivo número cinco Igualdad de género contiene seis metas de las cuales, tres están relacionadas con los derechos sexuales y reproductivos de las mujeres y las niñas:

Eliminar todas las formas de violencia contra todas las mujeres y las niñas en los ámbitos público y privado, incluidas la trata y la explotación sexual y otros tipos de explotación.

Eliminar todas las prácticas nocivas, como el matrimonio infantil, precoz y forzado y la mutilación genital femenina y

Asegurar el acceso universal a la salud sexual y reproductiva y los derechos reproductivos según lo acordado de conformidad con el Programa de Acción de la Conferencia Internacional sobre la Población y el Desarrollo, la Plataforma de Acción de Beijing y los documentos finales de sus conferencias de examen. (ONU, 2016, p.17)

Los primeros doce años del siglo XXI fueron para México escenario de un hecho inédito: la conducción del gobierno federal por el Partido Acción Nacional (PAN). Por primera vez en la historia del presidencialismo mexicano, hubo alternancia. La mayoría del electorado votó, primero en las elecciones del año 2000 y posteriormente en el 2006,<sup>6</sup> por los candidatos del PAN, considerado el partido conservador y de derecha por excelencia en la política mexicana. El Partido Revolucionario Institucional (PRI), vía elecciones, volvió a retomar el poder ejecutivo para el sexenio comprendido de diciembre de 2012 hasta diciembre de 2018.

Es conocida en el ámbito nacional la posición conservadora del PAN en torno a los derechos sexuales y reproductivos, pues dicho partido se ha caracterizado por representar y defender más los

---

<sup>6</sup> Los resultados de esas elecciones fueron muy discutidos en los círculos políticos por la desconfianza en las instituciones electorales. No es objeto de este artículo tomar posición al respecto.

intereses del empresariado y de la Iglesia católica en México que los del resto de la población.

Sin embargo, resulta paradójico que en la docena de años gobernados por el PAN se impulsaron y aprobaron leyes significativas para la igualdad de las mujeres, normas oficiales mexicanas sobre los derechos sexuales y reproductivos, y diversos programas para tratar de resolver, cuando menos, tres de los problemas más preocupantes en torno a la salud sexual y reproductiva, como lo son el embarazo en niñas y adolescentes, la mortalidad materna y la reducción del VIH/sida en jóvenes.

En general, hubo un avance considerable en las políticas públicas generadas en esos 15 años, tanto en las iniciativas de ley aprobadas en las cinco legislaturas que funcionaron en el periodo analizado, como en las normas oficiales mexicanas y en los programas diseñados para la solución de las necesidades y problemas en torno a la salud sexual y reproductiva. Sin embargo, como ya se señaló, uno de los retrocesos más graves fue la penalización del aborto, aprobada por los congresos locales de 19 estados de la república mexicana.

En el diseño de las políticas públicas relacionadas con la problemática y necesidades de las mujeres y de otros grupos sociales, han participado feministas de asociaciones civiles y de la vida académica, así como diputadas y funcionarias comprometidas con la agenda de género, quienes han garantizado la perspectiva de género y el enfoque de los derechos humanos en las tres modalidades de la política pública que desarrollaremos más adelante.

## REFERENTES TEÓRICOS

Para analizar la problemática y desarrollo de la política pública en México sobre la salud sexual y reproductiva se retomó la fundamentación teórica de los estudios de género. Este enfoque permite conocer las brechas de género entre mujeres y hombres tanto en

el diseño como en la operación de las políticas públicas en salud sexual y reproductiva.

Como dice Teresita de Barbieri (1993):

El género es el sexo socialmente construido. Rubin (1986) lo define como: “El conjunto de disposiciones por el que una sociedad transforma la sexualidad biológica en productos de la actividad humana y en el que se satisfacen esas necesidades humanas transformadas”.

En otras palabras: los sistemas de género/sexo son los conjuntos de prácticas, símbolos, representaciones, normas y valores sociales que las sociedades elaboran a partir de la diferencia sexual anátomo-fisiológica y que dan sentido a la satisfacción de los impulsos sexuales, a la reproducción de la especie humana y, en general, al relacionamiento entre las personas. (p. 149-150).

Conceptualmente, *política pública* es un proceso que incluye la realización de un diagnóstico sobre una o varias problemáticas y/o necesidades sociales o públicas; el Estado es el responsable del diseño de las soluciones de las necesidades detectadas, la puesta en práctica se realiza mediante un gobierno y su administración pública y, finalmente, amerita una etapa de evaluación (Aguilar, L., 1992a; Bardach, E., 1999).

Y respecto del concepto *político* retomamos la definición de Aguilar Villanueva (1992b):

En la definición descriptiva de política se reconoce su aspecto institucional, es la decisión de una autoridad legítima, adoptada dentro de su campo legítimo de jurisdicción y conforme a procedimientos legalmente establecidos, vinculante para todos los ciudadanos de la asociación y que se expresa en varias formas: leyes, sentencias, actos administrativos... (p. 22).

Una política es el resultado de un conjunto de decisiones y acciones de numerosos actores políticos y gubernamentales. Para el autor una definición recopiladora de política es la de Plano *et al.*:



Reglamentos y programas gubernamentales, considerados individualmente o en su conjunto, esto es, los productos de las decisiones de autoridad de un sistema político, puede tomar la forma de leyes, órdenes locales, juicios de corte, órdenes ejecutivas, decisiones administrativas y hasta acuerdos no escritos acerca de lo que se debe hacer. Por política suele entenderse un conjunto o secuencia de decisiones más que una decisión singular acerca de una acción de gobierno particular. (Aguilar, 1992b, p 24).

En el periodo que se analiza aquí se concretan décadas de trabajo, de evaluaciones, de elaboración de diagnósticos, de esfuerzos locales, regionales y mundiales; de construcción de agendas, de intervención de personas expertas en planificación del desarrollo de los gobiernos nacionales y de organismos internacionales preocupados por lograr la incorporación de las mujeres al desarrollo. Ello dio lugar a la realización de numerosas Conferencias y Convenciones mundiales, con temáticas específicas, de gran utilidad para los movimientos de mujeres, para los gobiernos y para los propios organismos internacionales.

En este capítulo se retoman los conceptos clave emanados de organismos, de conferencias y convenciones internacionales que México ha ratificado en el tema de salud sexual y reproductiva. Entre los más emblemáticos están la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Conferencia Internacional sobre Población y Desarrollo, realizada en la ciudad de El Cairo, Egipto, en 1994, entre otras.

Para la OMS (2006) la sexualidad humana está intrínsecamente relacionada con el sistema sexo/género y la define como un aspecto central del ser humano presente a lo largo de su vida:

Abarca al sexo, las identidades y los papeles de género, el erotismo, el placer, la intimidad, la reproducción y la orientación sexual. Se vivencia y se expresa a través de pensamientos, fantasías, deseos, creencias, actitudes, valores, conductas, prácticas, papeles y relaciones interpersonales. La sexualidad puede incluir todas estas dimensiones, no obstante, no todas ellas se vivencian o se expresan siempre. La sexualidad está influida por la interacción de factores

biológicos, psicológicos, sociales, económicos, políticos, culturales, éticos, legales, históricos, religiosos y espirituales. (p. 5).

La definición es muy clara al referir que la sexualidad humana está condicionada, tanto cuando se ejerce como cuando no se ejerce, a la interacción de varios factores psicosociales e histórico-culturales y se expresa según el sexo y el género. Los hombres y las mujeres heterosexuales y las personas de la diversidad sexual,<sup>7</sup> ejercen su sexualidad de acuerdo con su historia de vida, su subjetividad y conforme a las construcciones sociales en torno a la sexualidad en el transcurso de la historia de la humanidad, y tienen necesidades que deben ser atendidas mediante derechos específicos.

En la Conferencia Internacional sobre Población y Desarrollo, realizada en la ciudad de El Cairo, Egipto, en 1994, se definieron la salud sexual y los derechos sexuales y reproductivos como:

la salud sexual entraña la capacidad de disfrutar de una vida sexual satisfactoria y sin riesgos de procrear, y la libertad para decidir hacerlo o no hacerlo, cuándo y con qué frecuencia. [...] cuyo objetivo es el desarrollo de la vida y de las relaciones personales... (ONU, 1994, Bases para la acción, 7.2)

...los derechos reproductivos abarcan ciertos derechos humanos que ya están reconocidos en las leyes nacionales, en los documentos internacionales sobre derechos humanos y en otros documentos pertinentes de las Naciones Unidas aprobados por consenso. Esos derechos se basan en el reconocimiento del derecho básico de todas las parejas e individuos a decidir libre y responsablemente el número de hijos, el espaciamiento de los nacimientos y el intervalo entre estos y a disponer de la información y de los medios para ello y el derecho a alcanzar el nivel más elevado de salud sexual y reproductiva. También incluye su derecho a adoptar decisiones relativas a la reproducción sin sufrir discriminación, coacciones ni violencia, de conformidad con

---

<sup>7</sup> Según el Consejo Nacional para Prevenir la Discriminación, 2016, la preferencia sexual se refiere al deseo erótico-afectivo y se expresa de las siguientes formas: lesbiana, gay, bisexual, heterosexual, transgénero, transexual, travesti e intersexual.

lo establecido en los documentos de derechos humanos. (ONU, 1994, Bases para la acción, 7.3).

“La salud sexual es parte de la salud reproductiva e incluye un desarrollo sexual sano, relaciones responsables y equitativas, y ausencia de prácticas dañinas relacionadas con la sexualidad, violencia, enfermedades, etc.” (ONU, 1994, Bases para la acción, 7.2)

A partir de esta Conferencia los gobiernos, los organismos multilaterales y las organizaciones de mujeres de la sociedad civil internacional se comprometieron a desarrollar e impulsar políticas de población que tuvieran como eje central los derechos sexuales y reproductivos de las mujeres.

## **LAS CONFERENCIAS Y CONVENCIONES MUNDIALES INFLUYERON EN LOS MARCOS NORMATIVOS NACIONALES**

Producto de las acciones mundiales y los nuevos conceptos acuñados en las conferencias y convenciones internacionales se avanzó a escala planetaria en la protección de los derechos sexuales y reproductivos. De los tratados e instancias cuya importancia es crucial para el desarrollo que han tenido y mantienen los derechos sexuales y reproductivos tenemos la Convención para la Eliminación de Todas las Formas de Discriminación contra la Mujer (CEDAW, por sus siglas en inglés) creada en 1979, y su protocolo facultativo, aprobado en 1999 (ratificado por México en 1981); el Protocolo Adicional a la Convención Americana sobre Derechos Humanos en Materia de Derechos Económicos, Sociales y Culturales “Protocolo de San Salvador” (1988); la Conferencia Mundial de Derechos Humanos (Viena, 1993); la Convención Interamericana para Prevenir, Sancionar y Erradicar la Violencia contra las Mujeres (Belem do Pará, junio de 1994), ratificada por México en 1996; la Conferencia Internacional de Población y Desarrollo (El Cairo, septiembre de 1994); la IV Conferencia Mundial de la Mujer (Beijing, 1995), y

los Objetivos del Milenio (2000), en específico los objetivos cinco y seis, referentes a los derechos sexuales y reproductivos.

México ha suscrito todos los acuerdos emanados de estas instancias, adquiriendo el compromiso moral y jurídico de garantizar el pleno ejercicio de los derechos sexuales y los derechos reproductivos de las mujeres, incluido el acceso al aborto seguro (Salazar, 2013). Estos compromisos, como se dijo anteriormente, aún no han sido cumplidos.

En concordancia con el proceso de creación y fortalecimiento de las normas de protección de los derechos sexuales y reproductivos en el mundo, en México estos son considerados, de manera parcial, en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, en la Ley General de Población y en su respectivo reglamento, en la Ley General de Salud y en su reglamento, y por último, en la Ley General de Educación. Tanto el marco jurídico internacional como el nacional abordan aspectos sobre igualdad y no discriminación, así como sobre salud sexual, reproducción y protección de la maternidad.

## **LOS PROBLEMAS PERSISTEN**

Aunque México logró cumplir parcialmente las metas establecidas en los ODM relacionados con los derechos sexuales y reproductivos, y a pesar de los avances mencionados en cuanto al marco normativo, los problemas en torno a la salud sexual y reproductiva persisten.

El objetivo cinco de los ODM, Mejorar la salud materna, tuvo dos metas: reducir, entre 1990 y 2015, la tasa de mortalidad materna y lograr, para 2015, el acceso universal a la salud reproductiva. El objetivo seis, Combatir el VIH/sida, paludismo y otras enfermedades tuvo las siguientes metas sobre el sida: detener y haber comenzado a reducir, para el año 2015, la propagación del VIH/sida y conseguir para el año 2010 el acceso universal al tratamiento de la enfermedad para todas las personas que lo necesiten (Unicef, 2000).

Según el informe del gobierno mexicano relativo al cumplimiento de los ODM (2015), no se cumplió con la meta principal del objetivo 5 de reducir la muerte materna a 22 defunciones por cada 100 mil nacidas(os) vivos, sin embargo, tomando en consideración que la línea base para el cumplimiento de los ODM fue a partir del año 1990, en este lapso de 25 años, la reducción de la muerte materna fue significativa, pues de 88.7 defunciones en 1990, se redujeron a 38 casos en 2015 (Oficina de la Presidencia de la República, 2015, p.25). Además, se logró cubrir la meta secundaria de acceso universal a la salud reproductiva en 72.3%.

En cuanto a la reducción de la prevalencia del VIH/sida se llegó hasta 0.23% en la población de 15 a 49 años, superando la meta que establecía el objetivo seis de los ODM de no rebasar el 0.6% en ese grupo poblacional.

Los principales problemas de las mujeres mexicanas continúan siendo el embarazo en niñas y adolescentes, la mortalidad materna, la imposición de métodos anticonceptivos, la esterilización forzada, la penalización del aborto, el maltrato a embarazadas y parturientas en los servicios de salud obstétrica, a veces, por no ser atendidas oportuna y adecuadamente, mueren durante la gestación, el parto o el puerperio, o paren en los pasillos o patios de las clínicas de salud; también las mujeres con problemas de infertilidad son objeto de discriminación al intentar acceder a técnicas de reproducción asistida<sup>8</sup>. En el ámbito laboral la discriminación de las mujeres ocurre por ser madres trabajadoras, por hostigamiento sexual, en los despidos por embarazo y a causa de las responsabilidades familiares que recaen en ellas, así como por

---

<sup>8</sup> En el Informe 2015 del Grupo de Información en Reproducción Elegida (GIRE), se plantea que las técnicas para la reproducción asistida son aquellos procedimientos que incluyen tanto la manipulación de ovocitos como de espermatozoides o embriones humanos para lograr un embarazo. Entre ellos se encuentra la fertilización *in vitro*, la transferencia de embriones, la donación de óvulos y espermatozoides, y la gestación subrogada. Aún no existe ley en el ámbito federal para regular estos derechos.



la prevalencia del VIH/sida en mujeres heterosexuales que están en edad reproductiva.

El embarazo en niñas y adolescentes sigue en aumento. Según datos de la Estrategia Nacional para la Prevención del Embarazo en Adolescentes, entre 2003 y 2012, el porcentaje de madres adolescentes aumentó de 15.6% a 18.7% y la tasa de mortalidad materna es más alta entre el grupo etario de 10 a 19 años que en grupos de más edad. (Segob/Conapo/Inmujeres, 2015).

Entre los nuevos métodos anticonceptivos están desde los dispositivos intrauterinos (DIUs) inertes hasta los dispositivos de cobre y los DIUs liberadores de espermaticida, los anticonceptivos orales con menos dosis hormonales y menos efectos secundarios, los anticonceptivos inyectables combinados, los parches, el anillo vaginal y el implante subdérmico, entre otros. (Sanz, s.f.)

¿Qué pasó con las políticas públicas diseñadas y puestas en marcha durante quince años para reducir, cuando menos, dos de los graves problemas que afectan a las mujeres en edad fértil y a la juventud en el ejercicio de sus derechos sexuales y reproductivos como son el embarazo adolescente y la mortalidad materna?

Acciones legislativas favorables para las mujeres en el periodo 2000-2015

Este apartado consiste en un recuento de las políticas públicas elaboradas por los gobiernos del periodo estudiado en tres modalidades. La más conocida es tal vez la que corresponde al ámbito legislativo, el de la creación de leyes. Otra modalidad es la de las normas oficiales mexicanas (NOM) y, por último, los planes y programas de gobierno para la aplicación de estrategias específicas para resolver problemáticas relacionadas con los derechos sexuales y reproductivos.

## **Leyes para incidir en la igualdad sustantiva y en los derechos sexuales y reproductivos**

Es importante abordar los avances legislativos con un orden cronológico que permita visualizar la creación de las leyes más relevantes de las que emana un conjunto de acciones de suma importancia para la atención de los problemas que aquejan a las mexicanas. En primer lugar tenemos la Ley del Instituto Nacional de las Mujeres, aprobada en 2001, que dio lugar a la creación del Inmujeres. Contar con una instancia encargada de las acciones de la administración pública federal para atender los múltiples problemas de las mujeres era una vieja demanda de feministas y de mujeres militantes de partidos de izquierda.

El objetivo general del Inmujeres es promover y fomentar las condiciones que posibiliten la no discriminación, la igualdad de oportunidades y de trato entre hombres y mujeres, el ejercicio pleno de todos los derechos de las mujeres y su participación equitativa en la vida política, cultural, económica y social del país bajo los criterios de transversalidad de género en las políticas públicas en las distintas dependencias y entidades de la administración pública federal, estatal y municipal, a partir de la ejecución de programas y acciones coordinadas o conjuntas (Ley del Instituto Nacional de las Mujeres, 2001, Artículo 4).

Unos años después se aprobó la Ley Federal para Prevenir y Eliminar la Discriminación. Esta ley se creó en 2003, entró en vigor en el mismo año y fue reformada el 20 de marzo de 2014; incorpora como conductas discriminatorias las siguientes acciones relacionadas con los derechos sexuales y reproductivos: “negar o limitar información sobre derechos sexuales y reproductivos, impedir el libre ejercicio de la determinación del número y espaciamiento de los hijos e hijas,” así como la libre elección de cónyuge o pareja. Estigmatizar y negar derechos a personas con VIH/sida y prohíbe explícitamente la discriminación a cualquier persona por su orientación sexual. (Ley

Federal para Prevenir y Eliminar la Discriminación, 2014. Capítulo II Medidas para prevenir la discriminación)

En 2006 se creó la Ley General para la Igualdad entre Mujeres y Hombres (LGIMH) y entró en vigor ese mismo año con el objetivo de lograr la igualdad sustantiva de las mujeres respecto de los hombres en todos los ámbitos de la sociedad. La ley define la *igualdad sustantiva* como “el acceso de las mujeres al mismo trato y oportunidades para el reconocimiento, goce o ejercicio de los derechos humanos y las libertades fundamentales” (LGIMH, 2006, artículo 5, párrafo V).

En 2007 se aprobó y entró en vigor Ley General de Acceso de las Mujeres a una Vida Libre de Violencia. Esta ley atiende la violencia sexual que se ejerce hacia las mujeres tanto en el ámbito público como en el privado. Se modificó en 2014 incluyendo en su articulado la violencia laboral definida como “la negativa ilegal a contratar a la víctima o a respetar su permanencia o condiciones generales de trabajo; la descalificación del trabajo realizado, las amenazas, la intimidación, las humillaciones, la explotación, el impedimento a las mujeres de llevar a cabo el periodo de lactancia previsto en la ley y todo tipo de discriminación por la condición de género” (Ley General de Acceso de las Mujeres a una Vida Libre de Violencia, Artículo 11).

En el año 2011 se reformó la Constitución Política Mexicana en materia de derechos humanos, los cuáles serán interpretados y respetados conforme a lo estipulado en la carta magna y los tratados internacionales. Queda prohibida la discriminación por las preferencias sexuales de las personas.

En 2012 se aprobó la Ley General para Prevenir, Sancionar y Erradicar los Delitos en Materia de Trata de Personas y para la Protección y Asistencia a las Víctimas de estos Delitos. En ese año también se aprobaron reformas a la Ley Federal del Trabajo. Dichas reformas incluyen varios artículos relacionados con los derechos sexuales y reproductivos de las trabajadoras, entre ellos tenemos la prohibición expresa de las pruebas de embarazo como requisito para la contratación, los despidos por motivos de embarazo, y el hostigamiento sexual por parte de jefes y compañeros de trabajo.

Además, se aprobaron las licencias por paternidad y la licencia por maternidad aun en casos de adopción. (Ley Federal del Trabajo, 2015, Reformas 2012).

La Ley General de Víctimas, aprobada en 2013, además de regular la atención a las personas que sufren las secuelas de un delito, considera la atención de los derechos sexuales y reproductivos de las mujeres víctimas, incluida la interrupción del embarazo en caso de violación. La Ley General de Instituciones y Procedimientos Electorales se decretó en 2014 y establece como obligación para los partidos políticos la igualdad de oportunidades y la paridad entre hombres y mujeres para tener acceso a cargos de elección popular. Después de su puesta en marcha esta ley ha permitido el incremento de mujeres en los cargos de representación popular.

En 2014 se aprobó la Ley General de los Derechos de Niñas, Niños y Adolescentes, de gran importancia ya que reconoce los derechos humanos de las personas menores de 18 años de edad, entre los que se encuentran el derecho a la supervivencia y al desarrollo, a la salud, a la educación y a no ser víctimas de violencia sexual. Enuncia los derechos de menores y adolescentes para recibir asesoría y orientación sexual y reproductiva. Resalta que el Estado debe garantizar que adolescentes embarazadas concluyan sus estudios; establece la creación de normas, protocolos y la conformación de instancias para evitar la violencia y el acoso escolar. También precisa que la edad para contraer matrimonio es a partir de los 18 años. Para las adolescentes embarazadas la ley asegura: “la prestación de servicios de atención médica respetuosa, efectiva e integral durante el embarazo, parto y puerperio, así como para sus hijas e hijos, y promover la lactancia materna exclusiva dentro de los primeros seis meses y complementaria hasta los dos años; así como garantizar el acceso a métodos anticonceptivos”. (Ley General de los Derechos de Niñas, Niños y Adolescentes, 2014, Artículo 50, VII).

También se modificaron artículos de la Ley General de Salud, de la Ley sobre Refugiados, Protección Complementaria y Asilo Político; de la Ley Federal de los Trabajadores al Servicio del Estado, y de

la Ley del Seguro Social. Las modificaciones a las leyes de Salud, a la de los Trabajadores al Servicio del Estado, y a la del Seguro Social son un avance significativo para las mujeres trabajadoras contratadas en instituciones y/o empresas en la denominada economía formal, pues los cambios incluidos son para promover y privilegiar la lactancia materna. Es un importante avance para procurar el disfrute de un derecho para toda madre trabajadora y velar así por la salud y nutrición de la niñez.

Por otro lado, representa un gran avance la armonización que se hace de la Ley sobre Refugiados, Protección Complementaria y Asilo Político, derivada de la reforma del año 2011 a la Constitución, en la cual se incluye, en el artículo 1º, la prohibición de la discriminación motivada por las preferencias sexuales de las personas.

En estos 15 años se produjeron varias reformas y leyes de gran importancia para eliminar la discriminación y la violencia contra las mujeres y personas de la diversidad sexual. Resalta la inclusión de los derechos sexuales y reproductivos de la niñez y la adolescencia. Las reformas a la Constitución permitieron que las legislaciones incorporaran el enfoque de los derechos humanos en sus contenidos.

### **Normas oficiales mexicanas (NOM)**

Las NOM son otra modalidad de presentación de las políticas públicas y también forman parte del marco jurídico nacional. En México existe, desde 1992, la Ley Federal sobre Metrología y Normalización que regula la elaboración de las NOM, que son de carácter obligatorio en el ámbito nacional, y las normas mexicanas (representadas con las letras NMX) que son voluntarias. “Las NOM son instrumentos con regulaciones técnicas que contienen la información, requisitos, especificaciones, procedimientos y metodología que permiten a las distintas dependencias gubernamentales establecer parámetros evaluables para evitar riesgos a la población, a los animales y al medio ambiente.” (Revista del Consumidor, edición Webcast #5, 2010).



La ley rige en toda la república y sus disposiciones son de orden público e interés social. Es competencia del Ejecutivo Federal vigilar el cumplimiento de las NOM, mediante las dependencias de la administración pública involucradas en ellas.

Las NOM se revisan cada cinco años a partir de la fecha de su entrada en vigor y los resultados se notifican al Secretariado Técnico de la Comisión Nacional de Normalización. De no hacerse la notificación, las normas pierden su vigencia y las dependencias que las expedieron deben publicar su cancelación en el Diario Oficial de la Federación. (Ley Federal sobre Metrología y Normalización, 2015)

Avances en las normas oficiales mexicanas que contemplan los derechos sexuales y reproductivos

La Secretaría de Salud ha jugado un papel muy importante en la presentación y adopción de las NOM con relación a los derechos sexuales y reproductivos de las mujeres. En total, fueron siete normas obligatorias adoptadas por la Secretaría de Salud y una norma voluntaria adoptada por la Secretaría del Trabajo, como se presenta a continuación.

En México, las infecciones de transmisión sexual (ITS) ocupan uno de los cinco primeros lugares en la demanda de consulta en el primer nivel de atención médica y se ubican entre las diez primeras causas de morbilidad general en el grupo de 15 a 44 años de edad con un efecto diferencial para la vida y el ejercicio de la sexualidad de mujeres y hombres. (NOM-039-SSA2-2002, Introducción).

La Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002 Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual, se creó con la finalidad de establecer y homologar los procedimientos y criterios de operación de los diversos componentes del Sistema Nacional de Salud para la prevención y control de las ITS.

A nivel nacional, el personal médico y paramédico de los sectores público, social y privado responsables de la atención para prevenir, tratar y controlar las ITS, está obligado a respetar y aplicar esta norma.

La finalidad de este instrumento es reducir la incidencia de las ITS mediante una educación integral que incluya la salud sexual y reproductiva y la promoción de la salud. Esta educación comprende actividades dirigidas a individuos, familias y grupos sociales para que aumenten su responsabilidad y colaboren de manera activa en el cuidado tanto de su salud como la de las mujeres embarazadas para disminuir el riesgo de transmisión en la gestación. En casos de productos potencialmente infectados, se establecerán las medidas de seguimiento y atención.

En relación con los servicios de planificación familiar existe la Norma Oficial NOM-005-SSA2-1993,<sup>9</sup> la cual adoptó la Secretaría de Salud y fue modificada en 2004 para incorporar el uso de la píldora de anticoncepción de emergencia. Esta modificación es muy importante y favorable para aquellas mujeres en edad fértil, incluidas las adolescentes, pues pueden recurrir a este método para evitar un embarazo no planeado.

En cuanto a la violencia familiar, sexual, y contra las mujeres existe la Norma Oficial Mexicana NOM-046-SSA2-2005, que define criterios para su prevención y atención. Fue expedida en el año 2005 y se le hicieron modificaciones en 2009, siendo lo más relevante y positivo el abordaje de la temática de la violencia sexual específicamente contra las mujeres, donde se incluye la violación, en cuyo caso, se especifica que todas las instituciones públicas y privadas que componen el Sistema Nacional de Salud están obligadas a ofrecer de inmediato y hasta en un máximo de 120 horas después de ocurrido el evento, la anticoncepción de emergencia, así como a proporcionar a la persona afectada información previa, completa y veraz sobre la utilización de este método para que tome una decisión libre e informada.

En caso de embarazo por violación, y previa autorización de la autoridad competente, en los términos de la legislación aplicable, las instituciones públicas

---

<sup>9</sup> Desde 1993, esta NOM incluye la vasectomía como método anticonceptivo para el sexo masculino.

prestadoras de servicios de atención médica deberán prestar servicios de aborto médico a solicitud de la víctima interesada; en caso de ser menor de edad, a solicitud de su padre y/o su madre o, a falta de éstos, de su tutora o conforme a las disposiciones jurídicas aplicables. (NOM-046-SSA2-2005, Criterios Específicos 6.4.2.7)

Además, un avance muy importante es que estipula la obligación de las instituciones públicas de atención médica, de contar con personal médico y de enfermería capacitado en procedimientos de aborto médico, no objetor de conciencia.

Existe una norma mexicana para la igualdad laboral y la no discriminación, su denominación es NMX-R-025-SCFI-2015, se adoptó en 2009 y es un instrumento de carácter voluntario que certifica a las organizaciones públicas, sociales y privadas que incluyen la perspectiva de género en sus prácticas de empleo. Fue modificada en 2012 y 2015 para actualizarla con la introducción de las buenas prácticas laborales que varias empresas e instituciones realizan en sus centros de trabajo a raíz de la certificación en el Modelo de Equidad de Género, elaborado y puesto en operación por el Inmujeres desde el año 2003. Considera los derechos sexuales y reproductivos de las trabajadoras al prohibir los despidos por embarazo, la solicitud de exámenes de ingravidez para otorgarles empleo, así como el hostigamiento sexual por parte de patrones y trabajadores; también protege todos los derechos relacionados con la maternidad de las trabajadoras. Esta norma la adoptó la Secretaría del Trabajo y Previsión Social.

También existe la Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y control de la infección causada por el virus de la inmunodeficiencia humana. Esta norma data del año 1993, fue modificada en 2000 y, posteriormente, en 2010. La justificación para las modificaciones realizadas fue la trascendencia que reviste la prevención y el control del VIH/sida para la salud de la población. Se actualizaron definiciones y la especificación de términos, disposiciones generales, medidas de prevención y control; asimismo, proporciona bibliografía básica. Las modificaciones fueron retomadas de

los puntos de vista, propuestas y resultados de investigaciones que diversas dependencias gubernamentales, organismos de la sociedad civil, no gubernamentales y privados, realizaron al respecto en diversos ámbitos. Un significativo avance de esta NOM es que señala que la población en riesgo de adquirir la infección por VIH son hombres y mujeres que tienen vida sexual activa y que, independientemente de su orientación sexual, realizan prácticas sexuales sin protección. Esto rompe con el estereotipo, que aún persiste, de que sólo los homosexuales son los transmisores del virus.

En relación con los derechos de niñas, niños y adolescentes, la Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA3-2010, regula la prestación de servicios de asistencia social en situación de riesgo y vulnerabilidad. Entre las actividades que deben de cumplir los establecimientos que prestan servicios de asistencia social a este sector está la de otorgar orientación para prevenir riesgos a la salud sexual y reproductiva. De igual manera, para la atención de la salud de población perteneciente al grupo etario de 10 a 19 años de edad, se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA2-2015. Uno de los avances de esta NOM es que las personas de 10 a 19 años podrán solicitar directamente al personal de salud consejería en materia de salud sexual y reproductiva: planificación familiar, métodos anticonceptivos, orientación para la prevención del embarazo no planeado y para la prevención de las ITS siendo opcional, para quien solicite estos servicios, la presencia o acompañamiento de algún familiar mayor o de la persona tutora legal. Es decir, no es obligatoria la presencia de estos para recibir los servicios.

En cuanto a la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y de la o el recién nacido, la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-1993 establece los criterios y procedimientos para la prestación de tales servicios. Esta norma, modificada recientemente, ahora se conoce como Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-2016 Para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y de la persona recién nacida, utilizando un lenguaje incluyente en el nombre de la norma.

Las normas descritas son de gran importancia, pues regulan los servicios médicos de acuerdo con los lineamientos que defienden los derechos sexuales y reproductivos de las personas. Hacer una difusión responsable y oportuna debería ser una de las tareas del Estado mexicano para el pleno disfrute de los beneficios que la aplicación de dichas normas supone. Cabe señalar que en la elaboración de las NOM mencionadas participaron organismos de la sociedad civil y expertas en los temas de salud sexual y reproductiva.

### **Programas de gobierno**

Los principales programas desarrollados en torno a la salud sexual y reproductiva, provienen de los planes nacionales de desarrollo (PND). En los PND se especifica la política que desarrollará en sus seis años de gobierno el Presidente y su gabinete en los aspectos socioeconómicos, políticos y culturales, con la finalidad de mejorar la situación de la población y promover el desarrollo del país. Desde el año 2000, los gobiernos plantean en sus políticas la inclusión de la perspectiva de género como eje transversal para todos los programas y para la estructura organizativa de la administración pública federal, estatal y municipal, y también incluyen dentro del PND un eje rector para incidir en el logro de la igualdad de las mujeres respecto de los hombres.<sup>10</sup>

Los programas más significativos que los gobiernos pusieron en marcha en el periodo señalado para incidir en la solución de los principales problemas de las mujeres mexicanas, relacionados con la salud sexual y reproductiva, giraron alrededor de cuatro temas relacionados con los compromisos internacionales ya descritos anteriormente: 1) la planificación familiar y la anticoncepción, 2) el embarazo en niñas y adolescentes, 3) la mortalidad materna y, 4) el VIH/sida.

---

<sup>10</sup> En el PND 2001-2006 se planteó la creación del Inmujeres.



## **Programas desarrollados en los sexenios gobernados por el PAN (2001-2012)**

En este periodo se realizaron varios programas en torno a la salud sexual y reproductiva, entre los más significativos están el Programa Arranque Parejo en la Vida 2001-2006 y su continuación en 2007 hasta 2012; el Programa Oportunidades 2001-2006, y 2007-2012; el Programa de Acción Específico 2007-2012 Salud Sexual y Reproductiva para Adolescentes, el Programa Becas de Apoyo a la Educación Básica de Madres Jóvenes y Jóvenes Embarazadas (Promajoven) 2007-2012; el Programa de Estancias Infantiles para Apoyar a Madres Trabajadoras 2007-2012, y el Programa Seguro Popular de Salud, 2003 hasta la fecha (2016).

Por razones de espacio para la elaboración de este capítulo, se mencionan los programas más significativos en el tema, como son: Arranque Parejo en la Vida 2001-2006 y 2007-2012; el Programa de Acción Específico 2007-2012. Salud Sexual y Reproductiva para Adolescentes y el Programa de Becas de Apoyo a la Educación Básica de Madres Jóvenes y Jóvenes Embarazadas (Promajoven) 2007-2012.

### **Aspectos relevantes de los programas. Programa Arranque Parejo en la Vida 2001-2006 y 2007-2012**

Este programa inició su operación en el año 2002, durante el gobierno del presidente Vicente Fox Quesada, fue la principal estrategia para reducir la mortalidad materna como parte del Programa Nacional de Salud 2001-2006. En el siguiente sexenio, 2007-2012, gobernado por el también panista Felipe Calderón Hinojosa, se continuó con ese programa y se mantuvo el mismo nombre. Sin embargo, se incluyeron nuevas disposiciones como la atención a víctimas de violencia familiar y el impulso para ampliar la cobertura del Seguro Popular de Salud a la población no asegurada

por ninguna institución del sistema de salud. Los servicios de este programa abarcan la atención de los derechos reproductivos desde la planificación familiar, el acceso a anticonceptivos, la atención a embarazo, parto y puerperio, y la atención de abortos espontáneos. También se incluyeron en el programa Arranque Parejo de 2007-2012 nuevas metas respecto a la reducción del embarazo en adolescentes y a la prevalencia del VIH/sida. (Ver tabla “Metas de los Programas Nacionales de Salud, 2001-2018”)

### **Programa de Acción Específico 2007-2012 Salud Sexual y Reproductiva para Adolescentes**

El embarazo en la adolescencia fue considerado un problema de salud pública en ambos sexenios panistas, y para prevenirlo se diseñaron y llevaron a cabo programas específicos dirigidos a las y los jóvenes entre los 15 y 19 años de edad para el uso de anticonceptivos, incluido el condón, y así evitar los embarazos no deseados ni planeados.

Este programa tenía por objetivos otorgar información oportuna y atención amigable a las y los jóvenes en los centros de salud pública para facilitarles el acceso a métodos anticonceptivos y aumentar su uso, particularmente, incentivar el uso del condón en las relaciones sexuales en menores de 20 años, así como reducir el riesgo de que se embarazaran sin desearlo mujeres fértiles unidas de 15 a 19 años con voluntad de postergar su maternidad por un periodo de dos años o más, pero que no utilizaban ningún método anticonceptivo.

También se diseñaron acciones educativas para sensibilizar al personal médico y técnico sobre el papel tan importante que juega para hacer efectivo el respeto de los derechos sexuales y reproductivos de la adolescencia como son la prevención del embarazo no planeado, las ITS y el VIH/sida. Estos programas los llevaron a cabo la Secretaría de Salud y el Instituto Mexicano del Seguro Social.

## **Programa de Becas de Apoyo a la Educación Básica de Madres Jóvenes y Jóvenes Embarazadas (Promajoven) 2007-2012**

El objetivo de este programa es contribuir a la reducción del rezago educativo por medio de la entrega de becas a niñas y mujeres jóvenes entre 12 y 18 años 11 meses de edad, que se encuentren embarazadas o que ya tengan hijas(os). Con este apoyo, las beneficiadas pueden permanecer hasta concluir su educación básica. Existen evaluaciones positivas de este programa, realizadas por la Secretaría de Educación Pública (SEP, 2012) y por el Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (Coneval, 2012), ambas coinciden en que contribuyó al abatimiento del rezago educativo de las beneficiarias, así como al incremento del número de becarias cumpliendo con sus objetivos.

Los planes nacionales de salud, el Programa Oportunidades y el Programa Arranque Parejo en la Vida, son una muestra de la importancia de tomar en cuenta los resultados positivos de las políticas públicas de un sexenio, retomando dichos programas, mejorando las acciones y tratando de dar continuidad a lo iniciado.

En la actual administración federal (2012-2018) se retomaron dos de los programas exitosos iniciados en los sexenios panistas: el Programa Seguro Popular de Salud y el Programa de Becas de Apoyo a la Educación Básica de Madres Jóvenes y Jóvenes Embarazadas.

En la siguiente tabla se muestran las metas de los programas de salud, incluimos el Plan Sectorial de Salud del actual sexenio con la finalidad de comparar sus metas con los dos sexenios anteriores.

METAS DE LOS PROGRAMAS NACIONALES DE SALUD, 2001-2018*				
Programa Nacional de Salud 2001-2006	Embarazo adolescente	Mortalidad materna	Planificación familiar: Anticoncepción	VIH/sida
Meta:	No especifica.	Reducir a 35% con relación al año 2000.	Aumentar usuarias a 74%. Disminuir la fecundidad a 2.1 hijos(as) por mujer.	Reducir a 15% la prevalencia del sida en jóvenes de entre 15 y 24 años.
Programa Nacional de Salud 2007-2012	Embarazo adolescente	Mortalidad materna	Planificación familiar: Anticoncepción	VIH/sida
Meta:	Reducir a 58 nacimientos por cada mil mujeres de entre 15 y 19 años.	Reducir a 24%.	Aumentar el uso de anticonceptivos en adultas a 75%, y en adolescentes de entre 15 y 19 años a 47%.	Mantener la prevalencia de VIH por debajo de 0.6% en personas de entre 15 y 49 años. **
Programa Sectorial de Salud 2013-2018	Embarazo adolescente	Mortalidad materna	Planificación familiar: Anticoncepción	VIH/sida
Meta:	2018: reducir a 63.1 nacimientos por cada mil mujeres de 15 a 19 años de edad.	Reducir a 30 defunciones para 2018. ***	No plantea meta.	No plantea meta.
* Fuente: elaboración propia.				
** La meta está acorde con los ODM sobre la reducción de la prevalencia del VIH/sida. *** Llama la atención que la meta para reducir el número de defunciones en 2018 sea de 30 muertes por cada mil mujeres, lo que sugiere que desde la elaboración del plan, en 2013, se sabía por el sector salud y el Conapo que México no cumpliría con la meta de 22 defunciones señaladas en el objetivo cinco de los ODM. Aunque tomando en consideración que las muertes maternas registradas en 2013 fueron 38, esta meta nacional planteada para 2018 de reducir a 30 las muertes maternas es un avance significativo, aunque todavía insuficiente.				

## CONCLUSIONES

Las políticas públicas del periodo estudiado, dirigidas a atender a mujeres y jóvenes de ambos sexos, en el ejercicio de sus derechos sexuales y reproductivos, fueron de suma importancia. Sin embargo, no se lograron los resultados esperados, pues los embarazos en niñas y adolescentes van en aumento, mientras la muerte materna no logró reducirse.

De 2000 a 2015 se aprobaron ocho leyes, todas desde el enfoque de los derechos humanos. Se reformaron cinco legislaciones para incluir la no discriminación por preferencias sexuales o por razones de sexo. Por otra parte, se incrementó la violencia organizada, en general y la violencia hacia las mujeres, en particular. Crecieron los crímenes de odio contra personas de la diversidad sexual, los feminicidios y la trata de personas sobre todo de niñas y mujeres. Las nuevas leyes y las reformas a algunas de ellas, sobre todo las realizadas a la Constitución, obedecen a las demandas feministas, así como a la presión de organismos internacionales como la Corte Interamericana de Derechos Humanos, misma que realizó seis sentencias condenatorias al gobierno mexicano en un periodo de tres años (de 2008 a 2010) por omisión y/o acciones en contra de los derechos humanos de la ciudadanía.

Un obstáculo importante para la aplicación de las políticas públicas sobre derechos sexuales y reproductivos es la falta de presupuesto para la promoción de la igualdad sustantiva de las mujeres, de la educación sexual en el sector educación y para el sector encargado de proveer la salud pública.

Analizar el presupuesto asignado y ejercido en el sector salud, en beneficio de los derechos sexuales y reproductivos de las y los mexicanos, ameritaría una investigación específica que permitiera un análisis detallado de programas, así como de las asignaciones y recortes presupuestales en los años recientes.

Es necesario crear instancias neutrales de evaluación de las políticas y planes de gobierno. El Estado no puede seguir siendo juez y parte en la evaluación de las políticas de género y sexualidad. Se debe crear mecanismos evaluadores en los que participen especialistas en género, sexualidad y derechos humanos, de la sociedad civil organizada y de las universidades, que realicen evaluaciones para conocer los avances logrados en estos 15 años e identificar las mejoras que habrá que hacer a futuro.

La influencia de la Iglesia católica en la sociedad mexicana y en las esferas de poder, ha dificultado los esfuerzos del Estado por



resolver problemas que ya son considerados de salud pública como los embarazos no planeados en niñas y adolescentes, la mortalidad materna, la prevalencia del VIH/sida y las muertes de mujeres por abortos mal practicados, entre otros. Además, la Iglesia impide la difusión de información científica sobre salud sexual y reproductiva desde la educación básica.

Otros hechos que agravan la situación son la insuficiencia de personal médico, la falta de capacitación, el uso de infraestructura inadecuada reflejada en la escasez de materiales y camas, y el exceso de pacientes.

El éxito de las políticas públicas en derechos sexuales y reproductivos va más allá de la realización de diagnósticos y diseños adecuados para resolver tal problemática, ya que se trata de regular la sexualidad humana, ámbito de la vida considerado tabú para la sociedad, circunscrito a la vida privada de las personas y no de la sociedad en su conjunto.

La política sexual del país se configura de acuerdo con los mandatos y estereotipos de género: los hombres y las mujeres deben unirse para la reproducción, las mujeres no pueden sentir placer, cualquier expresión de la sexualidad diferente a la heterosexual debe prohibirse.

Es fundamental que el Estado mexicano diseñe y promueva un profundo cambio en los planes y programas de estudio, desde preescolar hasta bachillerato, donde se incluya, desde la perspectiva de género y de los derechos humanos, la enseñanza de los derechos sexuales y reproductivos para la niñez y la juventud de México, y donde también se impulse la formación de docentes para capacitarles en esta nueva e importante tarea. Asimismo, es de gran relevancia la difusión masiva de las políticas públicas en torno a la sexualidad, su vigilancia, monitoreo y evaluación. Habría que establecer mecanismos que apunten a la transparencia y rendición de cuentas para observar el cumplimiento de estas políticas, y también para sancionar su incumplimiento. Sólo así podríamos hablar de un verdadero compromiso con los derechos sexuales y reproductivos de las mujeres y la juventud en México.

## REFERENCIAS

- Aguilar, L. (1992a). *El estudio de las políticas públicas*, Colección Antologías de Política Pública. México: Porrúa. Recuperado en <http://www.inap.mx/portal/images/RAP/el%20estudio%20de%20las%20politicas%20publicas.pdf>
- Aguilar, L. (1992b). *La hechura de las políticas*. México: Porrúa. Recuperado en <http://www.inap.mx/portal/images/RAP/la%20hechura%20de%20las%20politicas.pdf>
- Ávalos, X. (2013). *Derechos reproductivos y sexuales*. México: UNAM/Instituto de Investigaciones Jurídicas Recuperado en <https://archivos.juridicas.unam.mx/www/bjv/libros/8/3568/38.pdf>
- Bardach, E. (1999). *Los ocho pasos para el análisis de políticas públicas*. México: CIDE/ Porrúa. Recuperado en [https://revistanotaalpie.files.wordpress.com/2014/05/6\\_los-8-pasos.pdf](https://revistanotaalpie.files.wordpress.com/2014/05/6_los-8-pasos.pdf)
- Carbonell, M. (2011). *Sentencias condenatorias contra México de la Corte Interamericana de Derechos Humanos*. Recuperado en [http://www.miguelcarbonell.com/docencia/Sentencias\\_condenatorias\\_contra\\_M\\_xico\\_de\\_la\\_Corte\\_Interamerica\\_de\\_Derechos\\_Humanos\\_printer.shtml](http://www.miguelcarbonell.com/docencia/Sentencias_condenatorias_contra_M_xico_de_la_Corte_Interamerica_de_Derechos_Humanos_printer.shtml)
- Carbonell, M. (2012). *La reforma constitucional en materia de derechos humanos: principales novedades*. Recuperado en <http://www.miguelcarbonell.com/articulos/novedades.shtml>
- Centro de Análisis e Investigación FUNDAR, 2017. Compromiso en salud, una simulación. Recuperado en <http://fundar.org.mx/compromiso-en-salud-una-simulacion/?ID=>
- Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el sida (Censida) (2015). *Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/sida en México. Registro Nacional de Casos de sida. Actualización al cierre de 2015*. Recuperado el 31 de agosto de 2016 en [http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/RN\\_Cierre\\_2015.pdf](http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/RN_Cierre_2015.pdf)
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social (Coneval) (2012). *Evaluación de Procesos. Programa Becas de Apoyo a la Educación Básica de Madres Jóvenes y Jóvenes Embarazadas (Promajoven)*. Informe final. Recuperado el 15 de junio de 2016 en [www.coneval.org.mx/Evaluación/Paginas/InformeEvaluacion.aspx](http://www.coneval.org.mx/Evaluación/Paginas/InformeEvaluacion.aspx)
- Consejo Nacional para Prevenir la Discriminación (Conapred) (2014). *El significado del Día Nacional de la Lucha contra la Homofobia desde la perspectiva del respeto al derecho a la igualdad y la no discriminación de todas las personas*. Recuperado el 25 de junio de 2016 en [http://www.conapred.org.mx/userfiles/files/Acercamiento%20Decreto%20Nacional%20Dia%20contra%20Homofobia%20\(accesible\).pdf](http://www.conapred.org.mx/userfiles/files/Acercamiento%20Decreto%20Nacional%20Dia%20contra%20Homofobia%20(accesible).pdf)

- De Barbieri, T. (1993). *Sobre la categoría género: una introducción teórico-metodológica*. *Debates en Sociología*, núm. 18. Recuperado el 6 de mayo de 2016 en <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/debatesensociologia/article/view/6680/6784>
- Federación Internacional de Planificación de la Familia (IPPF) (2009). *Derechos Sexuales. Una declaración de IPPF. Guía de bolsillo*. Londres: IPPF [https://www.ippf.org/sites/default/files/ippf\\_sexual\\_rights\\_declaration\\_pocket\\_guide\\_spanish.pdf](https://www.ippf.org/sites/default/files/ippf_sexual_rights_declaration_pocket_guide_spanish.pdf)
- Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (Unicef) (2000). *Objetivos de Desarrollo del Milenio*. Recuperado el 10 de junio de 2016 en <http://www.unicef.org/spanish/mdg/>
- Grupo de Información en Reproducción Elegida (Gire) (2015). *Niñas y Mujeres sin justicia Informe 2015*. Recuperado el 10 de junio de 2016 en: [www.gire.org](http://www.gire.org)
- Oficina de la Presidencia de la República (2015). *Los Objetivos de Desarrollo del Milenio en México. Informe de avances 2015*. Recuperado el 9 de agosto de 2016 en <http://www.objetivosdesarrollodelmilenio.org.mx/Doctos/InfMex2015.pdf>
- Oficina Regional de Educación para América Latina y el Caribe (OREALC/UNESCO Santiago) (2014). *Educación Integral de la Sexualidad: Conceptos, Enfoques y Competencias*. Santiago de Chile: OREALC/UNESCO Santiago <http://unesdoc.unesco.org/images/0023/002328/232800S.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2006) Recuperado el 27 de junio de 2016 en <http://aprendiendosexualidad.blogspot.mx/2008/06/educacin-sexual.html>
- Organización de las Naciones Unidas (ONU) (1994). *Informe de la Conferencia Internacional sobre Población y el Desarrollo*. Recuperado el 31 de mayo de 2016 en <http://www.un.org/popin/icpd/conference/offspa/sconf13.html>
- Organización de las Naciones Unidas 2016. *Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible. Una oportunidad para América Latina y el Caribe*. <http://www.sela.org/media/2262361/agenda-2030-y-los-objetivos-de-desarrollo-sostenible.pdf>
- Presupuesto de Egresos de la Federación. Años consultados: 2009 hasta 2015. Diario Oficial de la Federación.
2009. DOF: 28/11/2008. ANEXO 9 A. Presupuesto para Mujeres y la Igualdad de Género (millones de pesos). Página 68.  
[http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef\\_2009/PEF\\_2009\\_abro.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2009/PEF_2009_abro.pdf)
2010. DOF: 07/12/2009. ANEXO 10. Erogaciones para la igualdad entre mujeres y hombres (millones de pesos). Página 73.  
[http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef\\_2010/PEF\\_2010\\_abro.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2010/PEF_2010_abro.pdf)
2011. DOF: 07/12/2010. ANEXO 10. Erogaciones para la igualdad entre mujeres y hombres (pesos). Página 87.  
[http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef\\_2011/PEF\\_2011\\_abro.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2011/PEF_2011_abro.pdf)

2012. DOF: 11/12/2011. ANEXO 10. Erogaciones para la igualdad entre mujeres y hombres (pesos). Página 99.

[http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef\\_2012/PEF\\_2012\\_abro.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2012/PEF_2012_abro.pdf)

2013. DOF: 27/12/2012. ANEXO 12. Erogaciones para la igualdad entre mujeres y hombres (pesos). Página 55.

[http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef\\_2013/PEF\\_2013\\_abro.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2013/PEF_2013_abro.pdf)

2014. DOF: 03/12/2013. ANEXO 12. Erogaciones para la igualdad entre mujeres y hombres (pesos). Página 68.

[http://www.diputados.gob.mx/sedia/biblio/prog\\_leg/096\\_DOF\\_03dic13.pdf](http://www.diputados.gob.mx/sedia/biblio/prog_leg/096_DOF_03dic13.pdf)

2015. DOF: 03/12/2014. ANEXO 13. Erogaciones para la igualdad entre mujeres y hombres (pesos). Página 65.

[http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef\\_2015/PEF\\_2015\\_abro.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/abro/pef_2015/PEF_2015_abro.pdf)

Revista del Consumidor. (2010). Edición Webcast #56. Recuperado 25 de junio de 2016 de <https://revistadelconsumidor.wordpress.com/2010/01/31/webcast-56-%C2%BFque-es-una-norma-oficial-mexicana/>

Salazar M. (2013). Los derechos sexuales y reproductivos de las mujeres en México en el marco jurídico internacional. *Federación Mexicana de Universitarias*. Recuperado el 1 de julio de 2016 en [www.femumex.org/](http://www.femumex.org/)

Sanz, Elena, (s/f). Tres nuevos métodos anticonceptivos que deberías de conocer. Revista digital *Muy Interesante*. Recuperado el 10 de junio de 2016 en <https://www.muyinteresante.es/salud/articulo/tres-nuevos-metodos-anticonceptivos-que-deberias-conocer-541380277112>

Secretaría de Educación Pública (SEP) (2012). *Evaluación de Consistencia y Resultados 2011-2012. Programa Becas de Apoyo a la Educación Básica de Madres Jóvenes y Jóvenes Embarazadas* (Promajoven). Recuperado el 13 de julio de 2016 en [www.promajoven.sep.gob.mx/files/evaluaciones/externas/Evaluación\\_Consistencia\\_Resultados\\_2011\\_2012.pdf](http://www.promajoven.sep.gob.mx/files/evaluaciones/externas/Evaluación_Consistencia_Resultados_2011_2012.pdf)

Secretaría de Gobernación (Segob)/Consejo Nacional de Población (Conapo)/ Instituto Nacional de las Mujeres (Inmujeres) (2015). *Estrategia Nacional para la Prevención del Embarazo en Adolescentes, Enapea. 2014-2018*. Recuperado el 17 de agosto de 2016 en [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/55979/ENAPEA\\_0215.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/55979/ENAPEA_0215.pdf)

Suprema Corte de Justicia de la Nación. Resoluciones relevantes del Poder Judicial de la Federación. Recuperado en <https://www.scjn.gob.mx/derechos-humanos/derechos/162/resoluciones-relevantes-pjf> y <http://sjf.scjn.gob.mx/SJFSist/Documentos/Tesis/174/174316.pdf>

#### Leyes y Normas Nacionales

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Recuperado el 25 de julio de 2016 en <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/legis/reflxii.htm>

- Ley del Instituto Nacional de las Mujeres. Diario Oficial de la Federación. en [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/88\\_040615.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/88_040615.pdf)
- Ley del Seguro Social. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/doc/92\\_121115.doc](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/doc/92_121115.doc)
- Ley Federal de los Trabajadores al Servicio del Estado. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/111.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/111.pdf)
- Ley Federal del Trabajo. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/125\\_120615.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/125_120615.pdf)
- Ley Federal para Prevenir y Eliminar la Discriminación. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/262\\_011216.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/262_011216.pdf)
- Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/130\\_181215.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/130_181215.pdf)
- Ley General de Acceso de las Mujeres a una Vida Libre de Violencia. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4961209&fecha=01/02/2007](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4961209&fecha=01/02/2007)
- Ley General de Educación. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lge.htm](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lge.htm)
- Ley General de Salud. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/142\\_010616.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/142_010616.pdf)
- Ley General de Víctimas. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5284359](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5284359)
- Ley General para la Igualdad entre Mujeres y Hombres (LGIMH). Recuperado el 7 de junio de 2016 en [http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgimh/LGIMH\\_orig\\_02ago06.pdf](http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lgimh/LGIMH_orig_02ago06.pdf)
- Ley General de los Derechos de Niños, Niñas y Adolescentes. Última reforma publicada DOF 02-04-2014 Recuperado el 25 de julio de 2016 en [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212001/LGDNNA\\_041214.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212001/LGDNNA_041214.pdf)
- Ley sobre Refugiados, Protección Complementaria y Asilo Político. Recuperado el 25 de julio de 2016 en [www.sre.gob.mx/.../2-marco-normativo?](http://www.sre.gob.mx/.../2-marco-normativo?)
- Norma Oficial Mexicana NOM-005-SSA2-1993, De los servicios de planificación familiar. Recuperado el 25 de junio de 2016 en [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/005ssa23.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/005ssa23.html)
- Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA2-2016, Para la atención de la mujer durante el embarazo, parto y puerperio, y de la persona recién nacida. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5432289&fecha=07/04/2016](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5432289&fecha=07/04/2016)
- Norma Oficial Mexicana NOM-039-SSA2-2002, Para la prevención y control de las infecciones de transmisión sexual. Recuperado el 25 de junio de 2016 en [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/039ssa202.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/039ssa202.html)
- Norma Oficial Mexicana NOM-046-SSA2-2005, Violencia familiar, sexual y contra las mujeres. Criterios para la prevención y atención. Recuperado el 25 de

junio de 2016 en [http://www.inm.gob.mx/static/Autorizacion\\_Protocolos/SSA/Violencia\\_familiar\\_sexual\\_y\\_contra\\_las\\_mujeres\\_criterios\\_par.pdf](http://www.inm.gob.mx/static/Autorizacion_Protocolos/SSA/Violencia_familiar_sexual_y_contra_las_mujeres_criterios_par.pdf)

Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA2-2015, Para la atención de la salud de población del grupo etario de 10 a 19 años de edad. Recuperado el 25 de junio de 2016 en [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5403545&fecha=12/08/2015](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5403545&fecha=12/08/2015)

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA3-2010, Asistencia social. Prestación de servicios de asistencia social de niñas, niños y adolescentes en situación de riesgo y vulnerabilidad. Recuperado el 25 de junio de 2016 en [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5179462&fecha=25/02/2011](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5179462&fecha=25/02/2011)

Norma Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y control de la infección causada por el Virus de la inmunodeficiencia humana. Recuperado el 25 de junio de 2016 en [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5166864&fecha=10/11/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5166864&fecha=10/11/2010)

Norma Mexicana NMX-R-025-SCFI-2015, Para la igualdad laboral y la no discriminación. Recuperado el 25 de junio de 2016 en [www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5411973&](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5411973&)





---

## CAPÍTULO 2

### **X-ILAH K'OHA'AN (PARTERAS) Y PERSONAL MÉDICO ALÓPATA EN LA ATENCIÓN DEL EMBARAZO Y EL PARTO DE MUJERES MAYAS DE YUCATÁN Y QUINTANA ROO**

*Adriana Leona Rosales Mendoza*

#### INTRODUCCIÓN

En este capítulo se argumenta la necesidad de generar diálogos interculturales entre mujeres mayas, parteras (*x-ilah k'oha'an*) y personal médico institucional (del sector salud) dedicado a la atención del embarazo y el parto en el sur de Yucatán. Se subraya la pertinencia de recuperar los saberes comunitarios para el cuidado de la salud reproductiva de las mujeres, en particular los que provienen de las parteras, quienes continúan atendiendo embarazos y partos en numerosas comunidades indígenas, entre ellas, las mayas peninsulares. Se describen elementos de la práctica de partería, algunos de los intentos por institucionalizarla, así como los esfuerzos recientes para colocarla de nuevo en la agenda nacional de salud pública.

Entre los esfuerzos para incentivar la práctica de la partería, existen instituciones de educación superior, como la Universidad Intercultural Maya de Quintana Roo (UIMQROO) que han integrado en el plan de estudios de la licenciatura en Salud Comunitaria,

temáticas relacionadas con esta práctica. El capítulo presenta resultados de una investigación de corte cualitativo, basada en trabajo etnográfico, observación participante, seis entrevistas semiestructuradas (tres de las cuales se realizaron con personal de salud institucional, dos con profesoras universitarias, y otra, con una mujer maya), y finalmente, dos conversaciones informales con parteras, para explorar acerca de la atención que proporcionan a las mujeres en edad reproductiva y aquella que suministran los servicios médicos institucionales (alópatas).

Los testimonios fueron recabados en Tahdziú, una población de la zona maya del sur de Yucatán, donde predominan mayahablantes, así como en la UIMQROO, ubicada a unos 100 kilómetros del municipio yucateco. El estudio se sitúa en el medio ambiente social en el cual se indagó la relación que existe entre saberes y prácticas para la atención del embarazo y el parto en dos sistemas de salud: el tradicional y el institucional.

Cabe mencionar que hubo una producción importante de textos sobre el tema de la partería desde mediados de los años setenta hasta el 2000; sin embargo, en los últimos 15 años el interés por la temática decreció. En 2014 se empezó a escribir sobre la necesidad evaluar las condiciones en que se realizan las prácticas de partería, así como de regular y certificar las capacidades de las parteras (Alonso y Castañeda, 2014). El Comité Promotor por una Maternidad Segura en México (2014) realizó un estudio, con proyección hacia 2030, sobre el estado de las parteras en el mundo, haciendo énfasis en las parteras certificadas y en determinadas acciones sugeridas para certificar a las parteras técnicas profesionales en México.

El perfil de las parteras está bien definido ya que efectúan un trabajo no lucrativo, la mayoría son mujeres de edad avanzada, de escasos recursos económicos y con bajos niveles de alfabetización. Poseen habilidades técnicas y manuales para la atención del embarazo, el parto y el posparto (Güémez, 1997, p. 120), y a pesar de que han aumentado los nacimientos en hospitales, ellas siguen

ocupando un lugar distinguido en las comunidades indígenas y rurales.

El nivel educativo es un factor que incide en la tasa de fecundidad y en los problemas de salud materna. En Yucatán hacia el año 2000, una mujer con educación media superior tenía en promedio 1.7 hijos(as), mientras que una sin instrucción tenía cuatro. En el municipio de Tahdziú se observa una relación inversamente proporcional entre el nivel de escolaridad de las mujeres y su primer embarazo; es decir, a menor escolaridad se tienen más hijos(as). De la misma manera, las mujeres con mayor escolaridad acuden más frecuentemente a solicitar atención ginecobstétrica en el hospital comunitario del municipio aledaño de Peto.

### **La reproducción y el sistema tradicional de atención a la salud de las mujeres**

En la cosmovisión de los pueblos mayas, la reproducción biológica de los seres humanos tiene una profunda relación con la reproducción de la tierra. El significado de la matriz está vinculado con la fecundidad de la naturaleza; el útero es una metáfora de la tierra madre, portadora de las semillas que se convertirán en frutos (Nájera, 2000, p. 43). Al inicio del embarazo, la población maya yucateca lo nombra *t'su chíikpajal u na'k*, que quiere decir que una mujer “ya echó barriga”, aunque el término *na'k* también hace alusión al estómago. El dolor de parto se conoce como *mukul k'i'inan* que significa dolor intenso, enterrado, escondido; una dolencia que cambia de intensidad (Güémez, 2000, p. 317). A la placenta y el cordón umbilical se les describe como una sola parte del cuerpo o *u paares* y al ombligo como *tuuch*. La placenta representa un órgano íntimo por lo que la forma en que es manipulada en los hospitales se considera impropia, ya que se cree que influye en el destino de la o el bebé y en la futura fecundidad de la madre (Güémez, 2000, p. 311).

El papel de la mujer en la atención del embarazo y el parto ha sido predominante a lo largo de la historia, no obstante, durante la Colonia existieron en el área maya parteros o *aj-alansajo'ob*. “En la actualidad son muy pocos los varones dedicados a este oficio y son casos aislados en los pueblos de Kimbilá y Tzucacab” (Güémez, 2000, p. 323). Si hoy en día las mujeres de Tahdziú acuden al sector salud se debe a que los programas gubernamentales de ayuda social les exigen ser atendidas en dichos centros sanitarios. Sin embargo, el problema principal consiste en que el personal médico no conoce el idioma maya y mucho menos el entramado cultural del cuerpo y la enfermedad que persiste en los pueblos mayas. Esta situación ha sido ya señalada por quienes estudian la relación entre la salud tradicional y la salud institucional o alopática, en el sentido de mostrar que las diferencias lingüísticas dificultan la relación entre el personal médico y las pacientes. En el caso de las mujeres que se atienden por embarazo, parto y puerperio en hospitales del sector salud, el problema se agrava ya que quienes laboran ahí son incapaces de entender la concepción indígena sobre el dolor corporal.

Durante la observación etnográfica efectuada en Tahdziú se encontró que muchas mujeres no quieren asistir al centro de salud debido a los siguientes motivos: a) el personal médico y de enfermería no conoce ni respeta las prácticas prenatales y postnatales de la población indígena (costumbres alimenticias, masajes durante el embarazo, disposición de la placenta, y cuidados postnatales); b) el personal de salud no toma en cuenta las opiniones de las mujeres al aplicar ciertas prácticas de la medicina institucional, como las cesáreas, episiotomías, utilización del dispositivo intrauterino (DIU), salpingoclasia y la administración de medicamentos; c) en este contexto cultural, las mujeres embarazadas y parturientas sienten incomodidad y vergüenza si son atendidas por médicos varones; d) la mayoría de las mujeres de la comunidad son maya-hablantes que no encuentran interlocutores, ya que son atendidas por residentes en Medicina monolingües (que se expresan solo en español) procedentes de otros estados del país.

Hay un programa dentro de las políticas de salud que ha influido: Prospera; también está el Seguro Popular, se inscriben al programa, en donde todas las mujeres que están embarazadas deben de inscribirse, y al estar inscritas a este servicio médico, tienen que ir a pláticas que les dan sobre su embarazo, sobre su alimentación, sobre varios temas (Profesora asociada de la licenciatura en Salud Comunitaria, UIMQROO).

Pues sí, a veces las mujeres dicen que les dan un mal trato, o cuando es una persona que habla maya y se ve humilde, a veces son humilladas por los doctores, en cambio hay más comunicación con una partera porque desde que llega le pregunta cómo se siente, le habla como si fuera un familiar, con confianza, le brindan mucha atención y más afecto que en un hospital (Profesora titular de la licenciatura en Salud Comunitaria, UIMQROO).

En Tahdziú existen alrededor de seis parteras e innumerables sobadoras. La “sobada” o páats’ es el procedimiento mediante el cual —durante todo el embarazo— la x-jeet (sobadora) o la partera x-k’am chaampal (mujer que atiende a las enfermas) va “acomodando al niño” para proporcionar alivio a la futura madre (Güémez, 2000, pp. 323-324). En Tahdziú y en otras comunidades mayences del sur de Yucatán la nombran x-aalansajo’ob, y en otras comunidades mayences se le llama x-ilah-kohan “ella que visita a la mujer enferma”, y a la sobadora: x-hii’ k’ab o yoq’ omam (Nájera, 2000, p. 125). La páats’ o sobada se considera importante ya que, en la concepción indígena del cuerpo, los distintos órganos y partes se alinean en un “centro simbólico” o tip’te que mantiene el equilibrio y la salud; la sobada genera ese equilibrio corporal. Villa Rojas documentó que en Yucatán se concibe que el centro corporal se desequilibra cuando “la persona se siente totalmente desajustada, pierde el sueño, el apetito, el deseo sexual, se hace pálida y va enflaqueciendo poco a poco. Durante el embarazo se rompe el orden interno, dado que la matriz se expande (...) para evitarlo, es preciso que la mujer se someta a los consabidos masajes” (Villa Rojas citado por Nájera, 2000, 129). De acuerdo con una informante:



Se le dice *cirro* en español, en maya se le llama *tip'te*, y cuando la persona comienza a tener malestares, y esto no es solo en embarazadas, sino en cualquier persona, pueden ser niños, a veces se caen (...) y al caerse se sacude; es una arteria que pasa en medio de nosotros, que viene siendo el ombligo, es el *cirro*. Cuando se llega a mover de lugar, usted puede sumir en el ombligo los dedos y va a sentir los latidos que están brincando cuando el *cirro* no está en su lugar. Entonces hay que hacer una sobada para localizar el sitio en donde se encuentra y poder regresarlo a su lugar, porque si no, la persona comienza a tener malestares como diarrea, vómito, náuseas, les da diarrea, a veces no les da apetito (Profesora titular de la licenciatura en Salud Comunitaria, UIMQROO).

El enfoque de la medicina institucional sobre la atención del embarazo y el parto se centra en los avances tecnológicos, y resta reconocimiento a los sistemas tradicionales de salud, con el argumento de que “representan barreras para el desarrollo del capitalismo nacional y progresista” (Good, 1997, p. 23). En la actualidad persiste una concepción médica que desestima la enorme sabiduría de la medicina tradicional y del conocimiento empírico. Se concibe la partería como una “costumbre antigua”, que debe preservarse solo hasta que la medicina moderna logre cubrir todo el territorio mexicano, “es vista como una situación que se tiene que tolerar en el proceso de modernización, mientras se llega al punto en que la cobertura de servicios de la medicina biomédica y la tecnología sea total y ya no se necesite de ellas. La atención del parto por comadronas es sinónimo de procedimientos arcaicos” (Good, 1997, p. 24).

Otros enfoques, como la etnomedicina, pretenden rescatar el valor de las prácticas tradicionales, defendiendo la importancia y las ventajas de experiencias tales como el nacimiento en hamaca. Aunque, Marcia Good (1997) ya advertía sobre la “romantización” y el elogio acrítico de las prácticas tradicionales, ya que en aras de lamentar la desaparición de las parteras (representadas siempre como ancianas indígenas) reducen el análisis a conceptos tales como lo antiguo y lo nuevo; lo tradicional y lo moderno, “contribuyendo a formar una imagen de desintegración [al hablar]

de aculturación, de asimilación y de pérdida de valores culturales” (Good, 1997, p. 24), con lo que reproducen un discurso idealizado sobre el mundo indígena.

Fue en 1974 cuando se consideró integrar a las parteras rurales de todo el país en el sistema de salud institucional. “Para 1985 se había creado ya el IMSS-Coplamar, una división de estudios de la Medicina Tradicional que contempla una instrucción formal de las parteras empíricas (...) [que consiste en capacitarlas en] tres actividades: la instrucción inicial a nuevas aceptantes, curso de capacitación inicial y una reunión anual para evaluar actividades y reforzar conocimientos” (Güémez, 1997, p. 129).

De acuerdo con este autor, la formación de las parteras llevada a cabo en la década de los ochenta, favoreció la comunicación entre el personal médico alópata y las parteras, y permitió que se incrementara el respeto hacia las prácticas de la medicina tradicional. El éxito del programa se debió en buena parte a la capacidad de liderazgo de las parteras, quienes lo ejercieron tanto en las capacitaciones, como en sus comunidades. Esas habilidades les permitieron jugar el papel de enlace entre las instituciones de salud y las mujeres embarazadas. Aunque se logró una efectiva comunicación, muchas parteras continuaron renuentes a utilizar cierto instrumental médico durante el parto, y se empezó a gestar la posibilidad de construir posadas de nacimientos, en las cuales, las parteras serían las responsables directas (Güémez, 1997), cuestión que se retomaría en la propuesta de 2014, como se verá a continuación.

A pesar de que el modelo resultó exitoso, generó confrontaciones entre las parteras rurales y el personal médico institucional. Este último consideraba (y muchos aún lo piensan) que la partería es antihigiénica, no científica y que pone en riesgo la salud de las madres y sus hijas o hijos. Por su parte, las parteras argumentaban que en la medicina general y en la ginecología se emplean medicamentos de alto riesgo con el fin de inducir el parto, y sus prácticas no favorecen el contacto familiar en el momento del alumbramiento (Güémez, 1997). Por otro lado, existen tensiones entre las parteras certificadas

y las que no lo están, ya que en la actualidad las primeras consideran que la atención que proporcionan es mejor que la que otorgan aquellas que no se han capacitado. Una partera certificada comentó que las no certificadas no tienen habilidades para resolver un parto complicado, mientras que ella sí sabía qué hacer, además de tener los instrumentos médicos necesarios y esterilizados.

Aunque, en ciertos sentidos, se reconoce el valor y la importancia de la partería, su práctica se ha reducido considerablemente debido a la hegemonía del modelo biomédico; no obstante, en 2014 se llevó a cabo un estudio diagnóstico con el fin de evaluar las condiciones de las prácticas de las parteras en el país. Con ello, se pretende reiniciar el proceso de regulación y certificación, a través de la creación de un documento que evalúe las competencias, en el cual se especifique la definición de partera y se determinen los conocimientos y habilidades que debe poseer. La creación de este documento dará pie a la instauración de mecanismos de certificación, de modelos de atención en los diferentes sistemas de salud, y sentará las bases para la conformación de un Colegio Mexicano de Partería, cuya finalidad es la de adecuar las normas de salud vigentes, así como permitir la creación de casas de parto, en las cuales, las parteras sean responsables sanitarias sin necesidad de acudir a personal médico institucional (Alonso y Castañeda, 2014, p. 4).

Actualmente funcionan en el país cuatro escuelas de partería: Casa A. C., Luna Llena A. C., Mujeres Aliadas, y Escuela de Partería de Guerrero. Aunque cabe subrayar que la enseñanza escolarizada no es dominante en cuanto a la transmisión de conocimientos en el campo, pues la mayoría de las parteras expertas aceptan aprendices, y aquellas que están certificadas imparten cursos y talleres no formales tanto a mujeres como a hombres (Alonso y Castañeda, 2014, p. 10).

Otras instituciones han evaluado la relevancia de esta práctica de medicina tradicional, entre ellas, la Universidad Intercultural Maya de Quintana Roo, en donde se imparten programas educativos vinculados con la realidad social y cultural de la península de

Yucatán. La licenciatura en Salud Comunitaria considera en su plan de estudios la materia “Partería”:

En esa asignatura vemos desde el inicio del parto, enseñamos a las y los alumnos a sobar. Ven los cuidados que se le da a la madre y al recién nacido con remedios tradicionales, qué plantas pueden utilizar en el momento del parto, cómo es el calentamiento que se le da al ombligo del recién nacido. De igual forma también aprenden a hacer la sobada que se hace después del parto para que el cuerpo de la mujer vuelva a cerrar todos sus huesos, ya ve que después del parto se abre todo el sistema óseo desde la cabeza hasta los pies (...) Como no hay mucha teoría, pues yo les digo que pueden investigar con parteras, con médicos tradicionales, gente adulta, gente mayor, que son los que saben de esos conocimientos y pues vemos la parte teórica y la práctica, a veces invitamos a una partera para que ella venga a ver a los muchachos (Profesora titular de la licenciatura en Salud Comunitaria, UIMQROO).

En México, la Asociación Mexicana de Partería (AMP) ha definido un plan estratégico para el periodo 2014-2017, que comprende “impulsar la partería como modelo autónomo para la atención materno-infantil accesible en México, regida por la Asociación como ente experta en el desarrollo de la profesión” (Alonso y Castañeda, 2014, p. 15).

Dado que se identificaron distintas problemáticas asociadas con la práctica de partería, entre las que destacan la escasez de estudios científicos sobre el tema, la carencia de escuelas suficientes que brinden la certificación, así como la persistencia de opiniones negativas sobre las parteras mexicanas, que es urgente erradicar, la AMP propone entre otras cosas:

En investigación: identificar los elementos que componen el modelo general de partería para visibilizar la necesidad de reconocer, profesionalizar y legitimar la partería en México. En difusión: fortalecer la presencia de la Asociación Mexicana de Partería entre actores sociales. En certificación: crear un

mecanismo de certificación legal representativa de la partería mexicana. En Pluriculturalidad: integrar a las parteras tradicionales en el proceso de certificación nacional (Alonso y Castañeda, 2014, p. 15).

En el ámbito mundial:

Los organismos internacionales han impulsado la integración de las competencias mínimas de la ICM [Confederación Internacional de Parteras, por sus siglas en inglés] como un marco internacional para poder definir que “una partera es una partera”. Esta frase implica que, a pesar de diferencias culturales, históricas, de práctica, ámbito y población, la ICM plantea que todas las parteras del mundo deben tener unas competencias mínimas de práctica. [Aunque] reconocen que cada país, región y ámbito clínico tendrá sus variantes y especificidades (Alonso y Castañeda, 2014: 15).

### **Partería comunitaria y medicina institucional**

Como se ha dicho, la práctica de la partería sigue siendo común en Tahdziú. Muchas mujeres sienten mayor confianza al tener a sus bebés con la *x-ilah k'oha'an* que acudiendo al Hospital Comunitario de Peto. Entre otras cosas, refieren la imposibilidad de expresarse en español, y consideran que el gobierno las obliga a asistir a las clínicas y hospitales institucionales mediante los apoyos que les brindan vía los programas de ayuda social. Una mujer, entrevistada a través de una intérprete, comentó lo siguiente:

Es que las señoras de la actualidad, es como obligatorio que tienen que ir al Seguro, ya sea por el ultrasonido o por el laboratorio de sangre y tienen que ir; en cambio en aquel tiempo [cuando nació su último hijo] no era obligatorio, una vez que te daban la vacuna ya, en tu casa pasabas los nueve meses y así (Mujer maya de Tahdziú, entrevistada a través de Noemí, intérprete maya-español).

Esta mujer ha sido atendida por una de las parteras no certificadas de la comunidad, doña Digna,<sup>1</sup> quien atiende muchos de los partos en Tahdziú.

Dice que solamente cuando siente dolor de espalda, o algo así, le habla a Doña Digna. Que le parece muy bien en su casa, porque en la casa te atiende la partera bien, en cambio en el hospital pues no; te ponen suero y después te dan de alta. En el Seguro hay veces que solo ven que no nace el bebé y los doctores buscan lo rápido, y buscan hacer cesárea. Ella nunca tuvo ningún bebé en el hospital, nunca; tuvo cuatro partos, el primera (sic) parto fue un niño especial y falleció desgraciadamente, tres años vivió el bebé y falleció, era un varón, pero le tenían una válvula, y a los tres años falleció el bebé. Dice que cuando se enferma no va al Seguro, va con el doctor particular porque él sí habla la maya (Mujer maya de Tahdziú, entrevistada a través de Noemí, interprete maya-español).

La labor de la partera comienza cuando ya se nota el crecimiento del vientre de la mujer. A partir de entonces acudirá semanal, quincenal o mensualmente a casa de la embarazada a brindarle los masajes necesarios para su bienestar y para el sano crecimiento del feto. Durante la sobada, de alrededor de 45 minutos, la partera transmite información sobre el cuerpo, el embarazo y el parto. Cuando la partera ha sido capacitada por el sector salud también proporciona conocimientos sobre anticoncepción, uso de medicamentos y material de curación (Alfaro, 2009). La sobada que se brinda durante el embarazo es distinta a la que se da en el momento del parto y en el posparto. De acuerdo con una maestra de la UIMQROO:

La partera no hace como en los hospitales que hacen el tacto; ella simplemente toca la parte de la pelvis y siente si el hueso de la pelvis se está abriendo. Al momento de hacer eso, si siente que ya se empezó a abrir, empieza a calentar

---

<sup>1</sup> El nombre fue cambiado para garantizar, en la medida de lo posible, el anonimato.



su agua, soba a la persona, toca para ver si el bebé ya está en posición para que nazca. Si ya está en posición, prepara un té para que haga el mismo efecto que la oxitocina, el té de *pichoi*, y se lo da a la parturienta. También le hace un té de canela; la canela hace que le entre calor al cuerpo y sea más fácil expulsar al bebé, se lo da a la mujer para que sea más rápido el parto (Profesora asociada de la licenciatura en Salud Comunitaria, UIMQROO).

Después que la o el bebé ha nacido, la partera lo coloca en el pecho de su madre con la finalidad de que lo alimente e inicien su interacción; solo después la comadrona cortará el cordón umbilical con un filo o navaja, y le dará más *pichoi* a la mujer, al tiempo que proporciona otro masaje en el vientre para que la placenta sea expulsada de manera natural, y no como ocurre con la medicina institucional, en la cual se realiza una segunda manipulación dentro del útero a fin de extraer la placenta.

La partera tiene la función de atenderla hasta que nazca el bebé, hasta quemar el ombligo, lavar la ropa del bebé y de la señora, cocinar, la alimentación sana, con gallina de patio. Después, la placenta la coloca, si es niña, dicen que lo ponen debajo de la piedra donde está el fogón para que aprenda todas las labores que hace una mujer, desde trapear hasta cocinar. Cuando es niño se tira en el monte para que no tenga miedo de nada y para que trabaje en el monte (Profesora titular de la licenciatura en Salud Comunitaria, UIMQROO).

Muy distinta es la atención del embarazo y el parto en las clínicas y hospitales del sector salud, pues a las condiciones ya señaladas sobre el manejo del idioma, el pudor de las mujeres y la falta de conocimientos sobre la cultura maya por parte del personal médico, se suma la idea de que la medicina institucional siempre es mejor que la tradicional, y que a través de programas como Prospera o el Seguro Popular habrá salud para los pobres. Aunado a lo anterior, la formación médica en materia de derechos humanos, perspectiva de género y enfoque intercultural en salud es deficiente. Si bien es cierto que el embarazo temprano es hoy en día un problema social

y de salud en México, también lo es que los programas y estrategias gubernamentales deben considerar las enormes diferencias culturales existentes en nuestro país. En culturas indígenas las uniones entre personas muy jóvenes y el consecuente nacimiento de las y los hijos son sumamente valorados, muchas veces porque no existen condiciones para que las personas continúen en la escuela, y mucho menos en las universidades, y otras porque siguen haciendo falta manos para el trabajo en el campo o en la casa. Dicho sea de paso –pues no es el objetivo de este capítulo–, los elementos arriba mencionados son raramente tomados en cuenta al momento de definir una estrategia de acción para desalentar las uniones y los embarazos tempranos, y en ese sentido, tales propuestas están condenadas al fracaso. Mientras quienes atienden en el sector salud no comprendan a cabalidad qué factores culturales inciden en las decisiones de las mujeres para ser madres jóvenes, o no valoren ciertas prácticas, como la partería y sus contextos, poco será lo que se pueda hacer para lograr un mayor desarrollo humano en las personas.

Volviendo a las prácticas alopáticas, para el médico institucional de Tahdziú, el problema de la salud de las mujeres radica en que se casan muy jóvenes y tienen mucha descendencia:

Prácticamente de 15, 16 años, no le podría decir; supongo que robársela significa que se va con él un día, se va, según la muchacha se va a vivir con él y ya con eso basta para que el día siguiente ya se hagan los preparativos de la boda (Médico del centro de salud de Tahdziú; no hablante de maya).

Sobre el mismo tema, el médico que otorga consulta privada dijo:

Hay casos que, este eh, hasta con el registro civil se complica un poquito. A veces el esposo tiene 16 años y la esposa 14 o 15 años, es que la cultura aquí es que ya si aprendes a hacer la comida, ya sabes hacer tortillas a mano, y ya sabes las labores de la casa, ya, ya te puedes casar. Entonces aquí las niñas desde pequeñitas, trabajan con la mamá, van a moler, hacen tortillas, aprendiendo como se debe. Ya cuando aquí, si cumples 18 años y no te has casado,

ya te está dejando el tren y luego los varones en su caso también, por eso muchos truncan en la secundaria (Médico particular de Tahdziú; bilingüe, mayahablante).

Una trabajadora social del Hospital Comunitario de Peto, se refirió también a las uniones tempranas en el municipio de Tahdziú:

Se casan jóvenes, como a los 16, en cambio aquí [en Peto] hay muchas mujeres que no se quieren casar y mejor prefieren estudiar, ir a la universidad. Aquí es un poco diferente que en Tahdziú porque una mujer puede trabajar; aunque también hay mucho machismo (Trabajadora Social del Hospital Comunitario de Peto; no hablante de maya).

La tasa global de fecundidad, entendida como el promedio de hijas(os) nacidos vivos que tendría una mujer en su vida reproductiva, es 2.0 en el Estado de Yucatán y 3.1 en Tahdziú (INEGI, 2008). Aunque de acuerdo con un médico de la comunidad:

El promedio de hijos es como seis o siete hijos, o sea siguen teniendo muchos hijos, siguen teniendo muchos hijos; de hecho, personas jóvenes eh, las personas que han terminado su secundaria hace cinco años, por ejemplo, son las personas que dicen que quieren planificar, pero después de que tengan sus cinco hijos (Médico del centro de salud de Tahdziú; no hablante de maya).

Según el INEGI (2010) la Secretaría de Salud ofrecía servicios al 94% de la población y el 4.09% se atendía con el médico privado de Tahdziú. En una visita, en 2014, al centro de salud, el médico informó que auscultaba a un promedio de diez mujeres al día, quienes acudían a consulta como beneficiarias del programa Prospera, pero la mayoría se atendía con alguna de las seis parteras que trabajaban en el municipio. El personal médico institucional solo interviene cuando el parto se complica y las parteras los llaman. En esos casos, las mujeres son trasladadas al hospital de Peto.

Hay todavía hay un poquito de restricción en ese aspecto, cuando se embarazan solo llegan a la clínica cuando algo se complica, que hay un sangrado, por ejemplo en los tres meses, o que haya algún otro problema que no pueda atender la partera. Vamos, a veces, creo que hay muchas embarazadas que ni siquiera se han registrado en el centro de salud (Médico particular de Tahdziú; bilingüe, mayahablante).

En Tahdziú no es generalizada la utilización de métodos anticonceptivos; muchas parejas utilizan el llamado “método del ritmo”, y otras se esconden de sus esposos para utilizar, sobre todo, los inyectables. El médico del centro de salud comentó que se imparten pláticas y se entregan métodos a quienes lo solicitan, en virtud de que se deben cubrir las metas del programa Prospera para disminuir la tasa de fecundidad:

Aquí es muy fuerte el tabú a los métodos de planificación familiar, la gente se esconde, los utilizan, pero a escondidas. Bueno, tal vez ya no tanto, pero recuerdo que hace cinco años, cuando llegué, era a escondidas. Nos decían empieza a buscar en mi ámpula, así le llaman, mi ámpula, cuando estaban solicitando su método de planificación familiar. Algo curioso de acá es que las suegras se oponían, entonces las mujeres a escondidas de las suegras solían llevar los métodos. Dentro de las pláticas que forman parte del programa, se les trata de inculcar, se les trata de dar la educación, la información. La información exactamente en cuanto a métodos de planificación, y de hecho ha aumentado mucho la población que utiliza los métodos de planeación (Médico del centro de salud de Tahdziú, no hablante de maya).

El médico que otorga consulta privada aseguró que muchas mujeres prefieren ir con la partera y con las o los médicos tradicionales. Reconoce que la medicina tradicional tiene gran peso en la comunidad, pues además del tratamiento con hierbas, el yerbatero comparte los códigos culturales, el idioma y las costumbres de la gente. En cuanto a la renuencia de las mujeres para acudir al centro de salud, el médico institucional dijo:

Son muy arraigadas las costumbres que hay aquí en Tahdziú. Había una enfermera que conocía a muchas personas del municipio, y es ella quien me ayudó a ir poco a poco con ellas. No podía llegar ahí y hablarles de salud reproductiva, mencionando eh mm métodos de planificación familiar, si no, más bien, iniciando con los beneficios que trae esta, y después ofertando los métodos, es un ejemplo ¿no? (Médico del centro de salud comunitario).

Coexisten dos concepciones de la salud muy diferentes. Por un lado, el sistema de salud institucional preocupado por las metas numéricas de atención de la salud, es decir, por el porcentaje de personas que reciben tratamientos médicos y por la cobertura a nivel nacional, independientemente de la calidad que se otorgue. Con personal de salud poco calificado en cuanto al idioma y la cultura maya, con escasa sensibilidad para escuchar a sus pacientes y, en general, con la premura de terminar con una residencia impuesta por el sistema para poderse establecer en alguna ciudad del país. Por otra parte, un sistema tradicional de salud, para el cual lo que importa es el cuerpo-persona y su equilibrio, en función de mantener o recuperar la salud. Con parteras –muchas de las cuales no han sido certificadas institucionalmente– que han recibido conocimientos de manera empírica de parte de sus ancestros y brindan consejos, atención más humana y personalizada, preparan alimentos, lavan la ropa de la parturienta y disponen de la placenta de la manera en que fueron enseñadas.

En el fondo, no parecen ser sistemas irreconciliables, lo que hace falta es construir puentes que vinculen estos dos tipos de prácticas médicas. El enfoque intercultural de la salud es relevante, pero no basta con capacitar técnicamente a las parteras, sino también al personal médico institucional para que logre establecer diálogos con personas pertenecientes a las diversas culturas que conviven en México. Esta formación debería iniciar por la sensibilización para el aprendizaje de un idioma indígena, además de las prácticas culturales de la región, localidad, municipio o comunidad para comprender los mitos, rituales, valores y costumbres que prevalecen en el

lugar en el que ejercen su profesión, ya que ello resulta imprescindible si se quieren generar propuestas de intervención para disminuir el embarazo temprano y la mortalidad materna. La práctica de la partería deberá reconocerse –con todas sus implicaciones, usos y costumbres– pues de otra manera no se está acudiendo a un verdadero diálogo entre culturas, es decir, a una propuesta de salud intercultural. Al hablar de “integrar” a las parteras al sistema de salud institucional, no debemos pensar en una suerte de “asimilación”, por el contrario, habrá que resignificar la palabra para entenderla como la acción de unir, de sumar, a la manera de un encuentro entre sistemas de salud distintos. La partería debe ser reivindicada, valorada, apreciada y respetada, pues es una práctica ancestral que conlleva múltiples conocimientos sobre el ser humano, el funcionamiento de las partes y órganos corporales, y comprende una concepción del equilibrio persona-cuerpo anclada en el universo y la naturaleza. En esta visión holística de la medicina tradicional y de la partería, el ser humano no podría existir sin el equilibrio del cosmos y la biodiversidad.

La perspectiva de género es importante, pues nos permite comprender la manera en que los cuerpos adquieren significados culturales basados en la anatomía y fisiología. Si bien es cierto que el embarazo, el parto, el posparto y la lactancia implican procesos biológicos que ocurren solo en las mujeres, la crianza, cuidado y atención de las otras y los otros, atraviesan por condicionamientos de género; en ese sentido, los papeles sociales se hallan definidos por lo que se considera propio que realicen las mujeres, por un lado, y los hombres, por otro. Aunque se comentó que en la época de la Colonia existían parteros, y que en algunas localidades del sur de Yucatán todavía es posible encontrarlos, la partería ha sido una tarea básicamente femenina, y lo es no solamente porque el embarazo y el parto les sucede a las mujeres, sino, sobre todo, porque es un trabajo dedicado al cuidado (actividad considerada femenina), pero que además, por el contexto en que se practica (la casa) es una profesión muy mal pagada, a diferencia de la carrera



de medicina que se ejerce en una institución y con un salario, lo que implica un pago mucho mayor. La formación en perspectiva de género (que debería brindarse de manera permanente al personal de salud) es necesaria también para comprender por qué, en ciertos espacios culturales, las mujeres son confinadas a ámbitos domésticos y al cuidado de la familia, y para entender también cómo el “eterno binario” (mujer-hombre, femenino-masculino, privado-público, adentro-afuera, pasiva-activo, maternal-no maternal, etcétera) construye sujetos definidos de acuerdo con el sexo biológico, en virtud de la concepción de la dualidad complementaria, sin la cual no sería posible la existencia humana. Esa representación de complementariedad vigente en culturas indígenas, y presente en el universo (Sol-Luna), la naturaleza (día-noche), el ser humano (hombre-mujer), e inclusive en las deidades prehispánicas, en las cuales existía, muchas veces, un principio femenino y otro masculino, justifican la distinción jerárquica entre las mujeres y los hombres, sus diferentes lugares de actuación y la sumisión de unas a otros. Explica también el ejercicio de la sexualidad solo para la procreación, pues esta es vista como un regalo de las deidades desde tiempos ancestrales. En ese sentido, no es de extrañar que las niñas esperen a tener 15 años para casarse y ser madres. Ello no significa que no se deba hacer algo al respecto; quienes diseñan políticas públicas podrían ver un poco más allá de su escritorio y proponer estrategias de acción acordes a las condiciones sociales, económicas y, sobre todo, culturales de cada sector de la población mexicana.

Por otro lado, es pertinente incorporar un enfoque desde los derechos humanos en el abordaje de la práctica de la partería, pues las mujeres que ejercen esta actividad son personas con derechos que deben ser respetados. En ese sentido, se vuelve a ubicar en el primer sitio al idioma materno, en este caso maya yucateco, pues resulta de vital importancia que quienes ofrezcan formación y capacitación sobre técnicas occidentales de salud reproductiva a las parteras de la región, se desenvuelvan en maya. Este debería ser el primer

derecho humano a enarbolar. Por otra parte, si se pretende que la partería recupere fuerza en el país, con miras a atender a innumerales mujeres que no son cubiertas por el sector salud, y dado que el Estado invertirá menos en salarios de personal médico y enfermeras, e inclusive en infraestructura, se debería considerar un pago gubernamental a las parteras, independientemente de la cantidad simbólica que reciben de parte de las familias de las parturientas, a saber, entre 300 y 1000 pesos por alrededor de seis meses de trabajo. Segundo derecho humano: un pago digno por un trabajo igual de digno que el del personal médico institucional. Es pertinente abordar un derecho más –aunque sin duda podríamos hablar de otros– el derecho a la integridad de la persona, el cual atraviesa por el respeto y el reconocimiento que se debe conferir a las mujeres que ejercen la partería, y dejar de considerarlas como personas que utilizan brebajes, inciensos, tecitos y trapos en ambientes insalubres, para así dignificar esta práctica médica tradicional.

## CONCLUSIONES

Como se ha visto en este capítulo, la práctica de la partería ha obedecido a las estrategias de política pública en salud planteadas en diferentes momentos históricos. La crisis por la que atraviesa la prestación de servicios de salud institucionales, ha vuelto de nueva cuenta la mirada hacia las parteras, pues ellas podrían representar un alivio en términos de la cobertura nacional de atención del embarazo y el parto; no obstante, hay mucho trabajo por realizar. Si bien es relevante capacitar a las parteras para mejorar la calidad técnica de la atención que brindan y fortalecer sus competencias, e identificar los elementos del modelo con la finalidad de reconocer, profesionalizar y legitimar la partería (Confederación Internacional de Parteras y la Asociación Mexicana de Partería, 2014), también es necesario crear las condiciones para la integración de las parteras tradicionales en un sistema de salud que las tome en cuenta, y que

tenga como principios rectores la interculturalidad, el enfoque de derechos humanos y la perspectiva de género.

Habría que estimar el liderazgo y el papel de las parteras rurales, ya que podrían representar un enorme apoyo en los programas de acción del gobierno federal, como la Estrategia Nacional para la Prevención del Embarazo en Adolescentes (Enapea, 2015) y la Agenda Sectorial para la Educación Integral de la Sexualidad, promovidas por el poder ejecutivo (2012-2018).

Su certificación podría incluir sensibilización en perspectiva de género y enfoque de derechos humanos, capacitación sobre el uso de tecnologías anticonceptivas y de prevención de ITS en jóvenes, y gestión de un modelo de planeación educativa para niños, niñas y jóvenes, a través del cual se pudiera acompañar la toma de decisiones informadas con relación a la vida futura: qué se quiere, en qué momento, cómo lograrlo; qué y por qué estudiar; cómo manejar la violencia, por ejemplo en el noviazgo; promoción del liderazgo en las niñas y las jóvenes, etcétera. Con esta formación, las parteras podrían erigirse como figuras de autoridad moral frente a madres, padres, familia en general, comunidad en su conjunto y, sobre todo, ante las y los jóvenes indígenas, teniendo la seguridad de que se respetarían las ideas, valores, usos, costumbres y entramado sociocultural de las comunidades en las cuales se llevara a cabo este tipo de intervenciones, pues quienes impartirían los cursos-talleres serían las mismas mujeres de la comunidad, es decir, las parteras.

Cabe aclarar que con “respeto al entramado cultural de las comunidades indígenas” no se pretende comunicar visiones idealizadas de las concepciones culturales ancestrales; las indígenas padecen desigualdades de género de maneras diferenciadas –en relación con mujeres de otros contextos étnicos, regionales y de clase social– que las llevan a casarse a corta edad, con hombres que, por lo regular, son mayores que ellas. Muchas veces, no toman decisiones propias sobre el número y espaciamiento de sus vástagos; la familia de ascendencia y por afinidad (sobre todo, suegras) controlan sus acciones, movimientos e ideas, y los varones (padres, hermanos,

esposos e hijos) deciden por ellas. Además, en general, poseen una escolaridad menor y aunque trabajan fuera de casa, en numerosas ocasiones no reciben un salario. Por todo esto, sería oportuno brindar formación y capacitación a parteras en temas de igualdad de género y derechos humanos, para que a su vez los hicieran llegar a las mujeres de sus comunidades.

Finalmente, también habría que considerar las necesidades de las mujeres durante el parto, ya que siguiendo los procedimientos institucionalizados, la parturienta es acostada en una camilla, teniendo más en cuenta “la comodidad” de quien la atiende que la de ella; cuando es sabido y mencionado por mujeres que han tenido hijas(os), que es más efectivo dar a luz en cuclillas o, incluso, de pie. Estas prácticas de parto son comunes en muchas comunidades indígenas del país, aunque tienden a desaparecer debido al predominio de la medicina institucional. Ojalá que la capacitación de las parteras rurales no contribuya a anular sus sabios procedimientos y, en cambio, propicie: que se revalorice la partería tradicional en beneficio de los alumbramientos, y los nuevos conocimientos adquiridos apunten a mejorar la salud reproductiva y la igualdad entre las mujeres y los hombres en contextos indígenas.

## REFERENCIAS

- Alfaro, A. (julio, 2009). Embarazo y parto en las mujeres mayas. *Revista Gaceta Bengala* 47. Recuperado el 21 de agosto de 2015 de [http://saladeprensa.uqroo.mx/gaceta/47/pag\\_52\\_a55.pdf](http://saladeprensa.uqroo.mx/gaceta/47/pag_52_a55.pdf)
- Alonso, C. y Castañeda, A. (junio, 2014). Análisis y recomendaciones para el fortalecimiento de la partería en México, *Asociación Mexicana de Partería A. C.* Recuperado el 21 de julio de 2016 de [http://www.asociacionmexicanadeparteria.dreamhosters.com/wp-content/uploads/2015/03/analisis\\_de\\_la\\_situacion\\_de\\_la\\_parteria\\_en\\_mexico.pdf](http://www.asociacionmexicanadeparteria.dreamhosters.com/wp-content/uploads/2015/03/analisis_de_la_situacion_de_la_parteria_en_mexico.pdf)
- Comité Promotor por una Maternidad Segura en México (2014). *El estado de las parteras en el mundo: oportunidades y retos para México*, OPS, OMS, UNFPA y Comité Promotor por una Maternidad Segura en México. Recuperado el 21

de julio de 2016 de [http://www.unfpa.org.mx/publicaciones/Las\\_parteras\\_del\\_mundo.pdf](http://www.unfpa.org.mx/publicaciones/Las_parteras_del_mundo.pdf)

Enapea (enero, 2015). Estrategia Nacional de Prevención del Embarazo en Adolescentes. Gobierno de la República. Recuperado el 12 de septiembre de 2016 de [http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/55979/ENAPEA\\_0215.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/55979/ENAPEA_0215.pdf)

Good, M. (junio, 1997). Parteras en Mérida. Una alternativa a la cesárea innecesaria. En *Revista Salud Problema, Nueva Época, No. 2*. Recuperado el 15 de julio de 2016 de [http://148.206.107.15/biblioteca\\_digital/estadistica.php?id\\_host=6&tipo=ARTICULO&id=1452&archivo=4-103-1452rrh.pdf&titulo=Parteras%20en%20M%C3%A9rida.%20Una%20alternativa%20a%20la%20ces%C3%A1rea%20innecesaria](http://148.206.107.15/biblioteca_digital/estadistica.php?id_host=6&tipo=ARTICULO&id=1452&archivo=4-103-1452rrh.pdf&titulo=Parteras%20en%20M%C3%A9rida.%20Una%20alternativa%20a%20la%20ces%C3%A1rea%20innecesaria)

Güémez, M. (1997) De comadronas a promotoras de salud y planificación familiar: el proceso de incorporación de las parteras empíricas yucatecas al sistema institucional de salud. *Cambio cultural y resocialización en Yucatán*. Recuperado el 20 de junio de 2016 en <http://www.mayas.uady.mx/articulos/comadronaspromotoras.html>

Güémez, M. (junio, 2000). La concepción del cuerpo humano, la maternidad y el dolor entre mujeres mayas yucatecas. *Revista Mesoamericana*. Recuperado el 2 de julio de 2016 de <http://www.mayas.uady.mx/articulos/concepcion.html>

INEGI, (2008). Estadísticas a Propósito del Día Mundial de la Población. *Datos de Yucatán*. Recuperado el 20 de agosto de 2015 en <http://www.inegi.org.mx/>

INEGI, (2010). Tabulados básicos. Censo Nacional de Población. Recuperado el 20 de agosto de 2015 de <http://www.inegi.org.mx/>

Nájera, M. (2000). La procreación y el desarrollo embrionario. En M. Nájera, *El umbral hacia la vida. El nacimiento entre los mayas contemporáneos* (p. 35-46). México: Programa de Maestría y Doctorado en Estudios Mesoamericanos, Facultad de Filosofía y Letras, Universidad Nacional Autónoma de México.

---

### CAPÍTULO 3

## **LA REPRODUCCIÓN ES UN ASUNTO DE PAREJA. EL TIEMPO PARA EMBARAZO COMO EVENTO CENTINELA Y SUS CONSIDERACIONES**

*Luz Helena Sanín Aguirre, Martha Elena Loya Loya,  
Dora Virginia Chávez Corral*

### **INTRODUCCIÓN**

Desde comienzos del siglo pasado, más como evento demográfico que de salud reproductiva, se mencionaba la necesidad de medir la fecundidad en las poblaciones humanas (Gini, 1977), entendiéndola como la capacidad biológica para concebir mediante relaciones sexuales sin el uso de métodos anticonceptivos; su unidad de análisis es la pareja como conjunto (Idrovo y Sanín, 2007).

Hoy se sabe que la concepción es un evento poco probable en términos estadísticos, ya que de 100 mujeres fértiles con vida sexual activa sin usar medidas anticonceptivas, solo 33% logra la concepción y tan solo 25% de ellas tendrá un embarazo detectable, si se considera que el tiempo promedio que tarda una mujer en asistir a consulta para confirmar un embarazo es hacia la sexta semana posterior a la concepción (Baird, 2013). La concepción, también conocida como fecundación, se refiere al proceso por el cual los dos



gametos (espermatozoide y óvulo) se fusionan en el ámpula de la trompa uterina durante la reproducción sexual para combinar sus genes y así crear una nueva y única vida (Carlson, 2014).

Para que la unión de los dos gametos se realice, es necesario que primero se hayan formado mediante un proceso conocido como gametogénesis; en el hombre se llama espermatogénesis y en la mujer ovogénesis. A manera de resumen, todo empezó desde que cada integrante de la pareja tenía dos semanas de gestación. En esa etapa embrionaria se forman unas células llamadas germinales primordiales, las cuales son precursoras de los gametos. Así pues, estos realizan una larga travesía hasta llegar a las crestas gonadales. Durante el trayecto los gametos se van multiplicando y diferenciando.

Al llegar, tienen una rápida proliferación mitótica: cada célula produce dos células diploides que se incrementan de cientos hasta millones. Ese patrón mitótico es diferente en las células germinales masculinas y femeninas. Las ovogonias tienen una intensa actividad mitótica en el ovario embrionario del segundo al quinto mes gestacional, donde alcanzan hasta siete millones de células, pero luego van disminuyendo. En la pubertad quedan 40 mil ovocitos, de los cuales solo llegan a ser ovulados 400 (Carlson, 2014). Cada mes se prepara una cohorte de 6 a 12, solo se libera uno, el folículo dominante (Harris y Selgrade, 2014; Mihm, Gangooly y Muttukrishna, 2011). En la espermatogonia, la división también empieza temprano, sin embargo esa capacidad de dividirse se mantiene a lo largo de toda la vida. En cada eyaculación se liberan millones de espermatozoides.

Durante ese proceso ocurre la replicación del DNA (ácido desoxirribonucleico) ya que tanto las ovogonias como las espermatogonias tienen dos divisiones meióticas, también diferentes. Se reduce la cantidad de cromosomas de diploides a haploides, lo cual permite mantener la dotación de la especie de generación en generación. Las ovogonias se transforman en ovocitos primarios (diplo-teno de la interfase I) y así permanecen; algunos completarán su

desarrollo en un ciclo menstrual completo y otros llegarán hasta la menopausia. Cuando ocurre la ovulación y hay fecundación se termina la segunda fase de la meiosis; si esto no ocurre, simplemente involucre y se elimina (Carlson, 2014).

En el caso del sexo masculino, cuando una espermátida pasa por la espermiogénesis para formar finalmente un espermatozoide, lo cual sucede más o menos en 64 días, pueden ocurrir alteraciones moleculares que afectan la viabilidad del gameto. Normalmente, hasta 10% de los espermatozoides tiene anomalías (doble cabeza o cola, flagelo defectuoso), sin que eso afecte su capacidad de fertilización. A medida que aumenta esta proporción, puede haber una disminución en la capacidad de fecundar.

Una vez terminada la formación de los gametos, estos tienen que ser transportados. Cuando el óvulo es expulsado (ovulación) es capturado por las fimbrias de la trompa uterina por acción hormonal porque sus células están más ciliadas y aumenta la contracción de su músculo liso. El transporte por la trompa suele durar tres o cuatro días.

Con respecto al transporte de los espermatozoides, estos tienen que ser movilizados tanto en el aparato genital del hombre como en el de la mujer. En el primero, después de la espermiogénesis, cuando ya están formados los espermatozoides en los tubos seminíferos del testículo, aún son incapaces de fecundar ya que son inmóviles, así que son transportados mediante el líquido testicular y las contracciones del músculo liso al epidídimo, donde maduran. En la eyaculación atraviesan con rapidez el conducto deferente y se mezclan con las secreciones de la próstata y la vesícula seminal. Son eyaculados de 2 a 6 ml de esperma normalmente, que contienen de 40 a 250 millones de espermatozoides; su pH debe ser de 7.2 a 7.8. Con una concentración de espermatozoides por debajo de 40 millones/ml, se disminuye la posibilidad de un embarazo y el tiempo para este es más retardado (Bonde *et al.*, 1998). Actualmente se dice que concentraciones arriba de 55 millones/ml son compatibles con la fertilidad (Slama *et al.*, 2002).

Cuando los espermatozoides son depositados en la vagina corren más riesgos para llegar a su objetivo: el ámpula de la trompa uterina. El primer obstáculo es el pH de la vagina y el útero, del cual son salvados por el líquido seminal que lo neutraliza. A continuación, muchos espermatozoides se quedan atrapados en las criptas del cuello uterino o por el moco del canal cervical, que tiene diferentes densidades, según el día del ciclo (días fértiles del 9 al 16). El paso por la cavidad uterina es rápido debido a las contracciones del músculo liso, puesto que los espermatozoides por sí solos se desplazan lentamente. De tal manera, van disminuyendo hasta quedar algunos cientos de ellos que se dirigen por atracción quimiotáctica, dada por factores de crecimiento (Yeh *et al.*, 2016) a una de las trompas, donde se capacitan. Varios lo intentan, pero solo uno de ellos será capaz de lograr su objetivo y podrá fecundar al óvulo. Entran en un proceso de hiperactividad e inician la competencia más difícil: la penetración de la corona radiada, integrada por células que rodean al óvulo, hasta encontrarse con la zona pelúcida que solo tiene una forma de entrar o llave-cerradura. Si se da la combinación, pasan. Aquí es la recta final: el que logra tocar la membrana celular del ovocito podrá penetrarla, dejando fuera solo su membrana celular y así se habrá logrado la concepción. Después se lleva a cabo el entrecruzamiento de los cromosomas maternos y paternos para dar inicio a una nueva vida (Carlson, 2014).

De esta unión surge el cigoto, el cual empieza con la segmentación (divisiones mitóticas); mientras esto ocurre, se desplaza por la trompa uterina para alcanzar el endometrio de la cavidad uterina, implantarse y continuar el desarrollo del nuevo ser. Este trayecto dura varios días. Es importante que estas células sigan rodeadas por la zona pelúcida hasta la cavidad uterina donde finalmente se van a perder. Tales células continúan dividiéndose, ya han modificado su estructura; formaron una mórula y ahora constituyen un blastocisto que tiene una capa externa llamada trofoblasto; al diferenciarse se adhiere al endometrio y establece la conexión entre el embrión y su madre. Liberará enzimas para llevar a cabo la implantación y

así lograr la supervivencia temprana del nuevo ser (Carlson, 2014). Hacia la cuarta semana de gestación la mujer puede darse cuenta de que está embarazada y, según su marco cultural y socioeconómico, acudirá o no al servicio de salud para confirmar su sospecha.

Esta digresión tan biologicista es para situar la concepción en su justa medida, ya que es casi un evento milagroso en el que intervienen muchos procesos, orquestados armónica y simultáneamente, en cada integrante de la pareja.

Para entender mejor el concepto de tiempo para embarazo (TPE o TTP en inglés) es necesario puntualizar alguna terminología. Se dice que una pareja es infértil cuando, después de un año de estar buscando un embarazo, este no ocurre, lo cual sucede aproximadamente en 15% de las parejas. En cambio, es fértil aquella que detecte un embarazo (independientemente del resultado final) durante el primer año. No todas las parejas logran concebir en el primer mes de intentarlo; hay una variabilidad biológica, influida por miles de factores de toda índole, que se mide por un término traducido burdamente del inglés *fecundability* como *fecundabilidad* que habla de la capacidad de las parejas fértiles de una población determinada para concebir durante el primer año. Hasta aquí es claro cómo este evento se gesta desde la concepción de cada progenitor.

Hoy por hoy se ha demostrado, por ejemplo, que las niñas prematuras pueden tener en su vida adulta problemas de fertilidad (Wildenschild *et al.*, 2015) ya que tienen niveles incrementados de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) hasta tres meses después del nacimiento, en comparación con niñas nacidas a término, lo cual puede indicar insuficiente madurez del eje hipotálamo-hipófisis-ovario.

Después, se pasa por los azares de la vida previa a la edad reproductiva o al momento en que se quiera ejercer este potencial. ¿Por qué, entonces, —y es lo que llama la atención— cuando la pareja no puede concebir, la ciencia, la sociedad, la familia y todo el mundo vuelve sus ojos a la parte femenina? La mujer es sometida a múltiples procedimientos diagnósticos, muchos de ellos invasivos y dolorosos,

mientras que al hombre, si acaso se le pide una muestra de semen, procedimiento para nada invasivo o desagradable, y se le deja de lado en el resto del diagnóstico. Ah! qué mal le va a la mujer, Bastaría saber lo que es una insuflación, una biopsia de endometrio y otros procedimientos que no son motivo de este capítulo, para imaginarlo.

Esto ocurre en el mejor de los casos, en sociedades relativamente tolerantes, que no estigmatizan a la mujer ni manifiestan el repudio que la condena al ostracismo y a veces hasta el exilio, pero en otras, baste recordar casos como el de Soraya, repudiada debido a su infertilidad, por el Sha de Persia, en una época no muy remota. Hasta hace muy poco tiempo no se exploraba en la anamnesis de una pareja en edad reproductiva ni la ocupación ni la exposición ambiental ni los estilos de vida ni mil cosas más que pueden afectar el proceso de cada una o ambas partes (Brugo-Olmedo, Chillik y Kopelman, 2003).

El tiempo para embarazo (TPE) indica cuánto tiempo le toma a una pareja concebir a partir de que lo decidió. La distribución del TPE de una población describe el grado de fecundidad de la misma. El TPE es la medida funcional de una vía común donde se encuentran los mecanismos mencionados anteriormente desde el punto de vista biológico. Su uso es complementario a los procedimientos de investigación, sobre el proceso biológico, que son necesarios para ver las condiciones médicas, porque la información acerca del TPE es fácil de obtener y provee un equivalente o indicador muy preciso y útil para la vigilancia epidemiológica, para identificar tendencias en el tiempo, ver variaciones espaciales y detectar factores de riesgo en el ámbito ocupacional o ambiental.

Puesto que la unidad de estudio es la pareja, se verán muchas covariables relacionadas con cada integrante de la misma. Esto le da especificidad de pareja al indicador TPE.

El TPE se calcula en meses; algunos autores le suman un ciclo más. Casi toda la literatura está de acuerdo en que los meses coinciden con el ciclo menstrual, y que las desviaciones son de días, porque el tiempo que se está estudiando es de ocho a nueve meses.

El TPE tiene la característica de ser un indicador fácil de estudiar, con alta sensibilidad e inclusive es rápido de obtener con una pregunta tan simple como: ¿Cuánto tiempo le tomó a usted y a su pareja quedar embarazados? (Idrovo y Sanín, 2007). Se ha observado que este tipo de pregunta no es invasiva ni rechazada por la mayoría de las culturas, porque no se interroga directamente sobre el número y frecuencia de las relaciones sexuales o los comportamientos íntimos, sino sobre la pareja que está buscando tener descendencia. Casi todas las culturas aceptan la pregunta de cuánto tiempo le tomó a la pareja lograr el embarazo. Además se ha demostrado que no es necesario indagar la cantidad y frecuencia de las relaciones sexuales, porque la libido se puede afectar por muchos factores. Asimismo se ha clarificado que el incremento de encuentros sexuales lo único que hace es aumentar la probabilidad de tener relaciones en un día fértil, pero por otra parte, la calidad espermática puede disminuir (Baird, 2013).

Los estudios de validación muestran que el TPE es recordado por los padres con una validez de hasta 20 años. Las mujeres tienen mejor capacidad de recordación, incluso ubican mejor en su memoria el TPE que los abortos y la prematuridad, los cuales, a veces solo la mujer recuerda y, en ocasiones, hasta puede haber un aborto del que el padre no se enteró.

El TPE puede preguntarse en cualquiera de las gestaciones; sin embargo, para buscar factores de riesgo y disminuir los confusores gineco-obstétricos, es mejor concentrarse en el primer embarazo, porque a veces de un embarazo a otro puede haber eventos relacionados o un aborto previo que retarde o acelere el embarazo siguiente. Se ha recomendado su uso por barato y fácil, porque lo vigila la pareja, pero se insiste en concentrarse en el primer embarazo (Idrovo y Sanín, 2007; Sapra, McLain, Maisog, Sundaramy y Louis, 2016; Schliep *et al.*, 2016). El artículo sobre las mujeres que trabajaron en la floricultura en Colombia mostró una prolongación en el TPE, que simplemente se asoció con la ocupación (Idrovo y Sanín, 2007), si bien permitió identificar lo



que pasaba en ese tipo de trabajo; ahora habría que profundizar si las exigencias ergonómicas y la exposición a plaguicidas tienen un efecto sobre ello.

En otros casos sirve para detectar los riesgos que implica el estilo de vida individual; por ejemplo, el aumento moderado en el riesgo de aborto temprano con autorreporte de exposición preconcepcional a herbicidas de ácido fenoxiacético, y con mayor riesgo para abortos tardíos con exposición a glifosato (Idrovo y Sanín, 2007). El TPE se vio afectado cuando los cónyuges reportaron exposición a diversos plaguicidas (dicamba, glifosato, herbicidas fenoxi, insecticidas organofosforados y tiocarbamatos) (Garry *et al.*, 2002).

La exposición ambiental en las labores domésticas puede ir acompañada de otros factores como la edad, el tabaquismo y el consumo de cafeína, con lo que se puede prolongar el TPE. (Idrovo y Sanín, 2007).

Por otra parte, llama la atención que tanto la edad femenina como la masculina pueden prolongar el tiempo para embarazo (Colin, Barroso, Gómez-López, Duran, y Oehninger, 2010; Lundsberg *et al.*, 2014).

## **FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A UNA PROLONGACIÓN EN EL TPE**

A partir de la década de los 80 se propuso la exploración del TPE como indicador de la exposición a condiciones ambientales dañinas. Durante los siguientes años se han estudiado dichos factores de riesgo asociados adversamente a la fertilidad, fecundidad y subfecundidad de hombres y mujeres provocando alteraciones desde la gametogénesis hasta la supervivencia temprana del cigoto (Gini, 1977; Guerra-Tamayo *et al.*, 2003). Algunos de estos factores se mencionan a continuación:

## **Edad**

La edad es un factor de riesgo para el TPE, afecta a mujeres entre los 35 y 40 años de edad, quienes tienen 50% menos probabilidades de embarazarse en cada ciclo; presentan dos veces más riesgo de aborto involuntario y cuatro veces mayor riesgo de anomalías cromosómicas que las mujeres más jóvenes. Esos efectos se agudizan después de los 40 años (Lundsberg *et al.*, 2014). Al aumentar la edad, el óvulo se vuelve incapaz de reanudar la primera división meiótica y, por lo tanto, nunca llegará a ser cigoto. Además, a partir de los 35 años va disminuyendo el número de folículos disponibles para formar la cohorte en cada ovulación. En el hombre, a partir de los 40 años comienza la expresión de marcadores apoptóticos en los espermatozoides, que indican el inicio de la fragmentación del DNA de los mismos, por el fenómeno natural de la apoptosis (Colin *et al.*, 2010).

## **Frecuencia y momento del encuentro sexual**

Las parejas que buscan un embarazo tienen mayor número de encuentros sexuales por ciclo. La situación se vuelve controversial porque, por un lado, puede suceder que en los días previos y durante la ovulación se presente un suministro de semen de baja calidad, pero por otro lado, se incrementa la probabilidad de tener un encuentro exitoso al coincidir con el día más fértil (Baird, Wilcox, y Weinberg, 1986).

## **Infecciones pélvicas**

Los procesos inflamatorios e infecciosos en el tracto reproductivo femenino y masculino pueden estar asociados a la fecundabilidad y esterilidad. En el aparato genitourinario masculino se presentan

tres tipos de infecciones: las de transmisión sexual (ITS), las de vías urinarias y las causadas por la microbiota bacteriana.

Entre las infecciones de transmisión sexual del tracto genital relacionadas a infertilidad/infecundabilidad masculina se pueden identificar las provocadas por: *Chlamydia trachomatis*, asociada con alteraciones en la concentración, movilidad, morfología y viabilidad de los espermatozoides; *Neisseria gonorrhoeae*, microorganismo capaz de unirse a los espermatozoides (a través de pilis), afectándolos de tal manera, que en el espermograma se puede observar la disminución de la cantidad y la alteración de su morfología; *Treponema pallidum*, se ha reportado, en modelos animales, la presencia intracelular de esta espiroqueta en espermatozoides, células de Leydin, fibroblastos y células intersticiales, la cual altera sus funciones celulares; otros microorganismos que perjudican la morfología y concentración espermática son: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*. También se ha reportado que el *Mycoplasma hominis*, daña a los espermatozoides porque tiene la capacidad de parasitar su cabeza y su pieza media.

La principal infección del tracto urinario masculino relacionada con la infertilidad/esterilidad es la tuberculosis, causada por el *Mycobacterium tuberculosis*, microorganismo que afecta: vejiga, uretra, epidídimo, testículos, conducto deferente y eyaculador, vesícula seminal y próstata. Esta infección por sí misma altera el proceso de la espermatogénesis, mecánicamente con la formación de granulomas y la fibrosis que sufren los tejidos del aparato genitourinario, lo que puede impedir la descarga del esperma. En cuanto a las infecciones por desequilibrio de la flora normal, se ha observado que las infecciones por *Staphylococcus coagulasa negativa* y por *Staphylococcus aureus* provocan cuantiosas apoptosis en los espermatozoides.

En los procesos infecciosos del aparato genitourinario masculino, la respuesta inflamatoria está dada por las moléculas receptoras de reconocimiento de patógenos tipo toll (TRL), presentes en las células de Sertoli. Estas secretan mediadores de la inflamación y moléculas reactivas del oxígeno (EOR) para limitar la infección.

Este mecanismo inmune tiene efectos secundarios sobre la célula espermática; por un lado se aumentan las EOR y por otro se modula negativamente el sistema antioxidante, el cual cae en un estrés oxidativo (EO) que mata al espermatozoide (Puerta-Suárez, Giraldo, Cadavid, y Cardona-Maya, 2014).

La afección femenina por procesos infecciosos se inicia con una infección vaginal que asciende hacia el útero y puede llegar hasta las trompas uterinas. Primero aparece el proceso inflamatorio que posteriormente cicatriza dando lugar a la obstrucción de la trompa, siendo el motivo más frecuente de la infertilidad, ya que evita el transporte de los gametos.

Dentro de los procesos infecciosos que provocan alteraciones en la fecundabilidad de la mujer se encuentran las ITS causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y el *Mycoplasma genitalium*, microorganismo emergente. Estas bacterias generan enfermedad inflamatoria pélvica, con la subsecuente subfecundidad. También las infecciones parasitarias ocasionadas por *Trichomona sp*, *Toxoplasma sp*, y *Esquistosoma sp*, se relacionan con subfecundidad. De igual manera, la presencia de *Lactobacillus sp* como flora normal vaginal, es esencial para evitar la subfecundabilidad ya que este bacilo mantiene el pH ácido que evita la colonización por microorganismos patógenos.

### **Consideraciones médicas**

Ciertas condiciones médicas en la mujer pueden asociarse con la reducción de su fertilidad, tales como: enfermedad tiroidea, endometriosis, síndrome de ovario poliquístico, fibroma uterino, enfermedad celíaca (por efecto secundario), enfermedad autoinmune HLA-DR, diabetes tipo I y tipo II, esclerosis múltiple, lupus y autoinmunidad.

Se ha observado que en mujeres a quienes se les realizó cuenta linfocitaria y tuvieron como resultado un mayor número de

linfocitos Th2 que de linfocitos Th1, lo cual no es habitual, en este caso, se asoció con mayor fecundidad (Baird y Strassman, 2000; Baird, 2013).

### **Pérdidas tempranas**

No hay evidencia fisiológica para retrasar un embarazo después de un aborto temprano, aun cuando la OMS recomienda un intervalo de seis meses. Sin embargo, el TPE se alarga un ciclo más en el segundo intento, después de pérdidas tempranas para aquellas parejas que lograron concebir en seis o menos ciclos menstruales. A más de 25% de las mujeres con pérdida les tomó tres o más ciclos embarazarse en el segundo intento. No es clara la razón, pero se encuentran involucradas situaciones de estrés y ansiedad (Sapra *et al.*, 2016; Schliep *et al.*, 2016).

### **Estrés energético y dieta**

El deporte o el trabajo físico extenuante, al igual que la malnutrición extrema, trastornan la capacidad reproductiva en la mujer, afectan el ciclo menstrual y, en situaciones excesivas alcanzan la amenorrea con la consecuente anovulación. Ambas situaciones reportan bajos niveles de progesterona lútea. El estrés energético que afecta la fecundabilidad está mediado por el eje hipotálamo-pituitario dando supresión ovárica que involucra estrógenos, insulina, IGF-1 y hormonas del estrés (Baird y Strassman, 2000).

El equilibrio hormonal de los hombres que practican deporte intenso presenta cambios leves que vuelven al valor normal unas horas después del entrenamiento. No se han demostrado efectos adversos en la secreción pituitaria o de gonodotrofinas. Algunos deportes como el ciclismo, waterpolo, triatlón o aquellos que alteran la temperatura escrotal, al ser practicados con alta

intensidad, pueden asociarse con la atrofia del epitelio germinal de los testículos; esto afecta la espermatogénesis y pudiera alterar el resultado del espermograma en cuanto a motilidad, recuento y morfología de los espermatozoides (Lucía *et al.*, 1996).

### **Sobrepeso, obesidad y distribución del peso en el cuerpo**

Otros factores de riesgo son el sobrepeso, la obesidad y la obesidad mórbida; se ha confirmado que en mujeres y hombres están asociados con la infertilidad y la disminución de la libido. El índice de masa corporal (IMC) impacta directamente al equilibrio hormonal porque, en la mujer, la leptina liberada por los adipocitos alcanza altos niveles cuando la grasa corporal está aumentada, esto afecta la secreción de las prostaglandinas, alterando la esteroidogénesis del ovario e impide la foliculogénesis y la circulación sanguínea perifolicular. Se perturba el ambiente intrafolicular del ovocito, lo que puede alterar la calidad tanto del ovocito como del embrión (Baird, 2013). En el hombre la obesidad influye en la caída de la testosterona, SHBG e Inhibina B y el alza de los niveles de estradiol, prolactina, leptina, FSH y LH; se ha asociado el sobrepeso y la obesidad con una mayor prevalencia de azoospermia y oligozoospermia (Sermondade *et al.*, 2013). En la mujer con sobrepeso y obesidad, si la grasa se encuentra almacenada mayormente en el abdomen, puede relacionarse con la infertilidad. El efecto sobre la reproducción puede ser invertido con la pérdida de peso, pero debe mencionarse que si una mujer tuvo sobrepeso en la adolescencia, repercutirá en su situación reproductiva en la edad adulta, independientemente del peso que tenga en ese momento (Baird, 2013; Hofny *et al.*, 2010; Sermondade *et al.*, 2013).



## **Contracepción hormonal y otros medicamentos**

El uso de la píldora anticonceptiva para el control natal, tiene efectos de subfertilidad en aquellas mujeres que la han usado por más de un año. No se ha demostrado efecto tardío en el TPE porque la prevalencia de la concepción se da dentro del primer año. Es necesario estudiar si la diferencia estriba de ciclo-a-ciclo, presentándose la concepción en ciclos más tardíos que en aquellas que no usaron anticonceptivos hormonales. Esto aún no se ha dilucidado. El uso de la píldora cíclica de bajas dosis (uso constante y prolongado), los implantes hormonales (como Norplant) y el dispositivo intrauterino liberador de levonorgestrel provocan subfertilidad, con tiempos para embarazo mayores a 12 meses (Baird, 2013).

Otros medicamentos que tienen dudosa asociación con el TPE son los compuestos tiroideos, antidepresivos, tranquilizantes y medicamentos utilizados para el asma. Se presume que lo que afecta son las condiciones subyacentes y no el medicamento. Las drogas antiinflamatorias, no esteroideas (NSAIDS), como aspirina, indometacina e ibuprofeno causan infecundidad porque bloquean la producción de prostaglandinas por la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa COX I y COX II. La ovulación e implantación requieren prostaglandinas, razón por la que las NSAIDS reducen la fecundabilidad (Lim *et al.*, 1997).

## **Exposición prenatal y en la adolescencia**

La exposición prenatal a factores de riesgo que afectan la fecundabilidad está demostrada. La mujer es especialmente sensible debido a que las células germinales de la reproducción se forman en su gestación y son estas mismas las que servirán para toda su vida reproductiva. Los cambios epigenéticos dados en la gestación, aun cuando no se puedan observar al nacimiento, pueden repercutir en la edad reproductiva con alteraciones en la función del

tracto reproductivo. Se cree que los ovocitos se producen antes del nacimiento y se quedan en los folículos primarios; se detiene su maduración en la profase I de la meiosis y continuará en los años reproductivos. La desmetilación de las células germinales sucede en etapas tempranas de la gestación. La remetilación subsecuente ocurre lentamente en el desarrollo folicular, por lo que todo aquello que altera los procesos de metilación puede afectar en el tejido adulto la regulación de los genes, incluyendo la capacidad de respuesta a los esteroides del tejido ovárico.

Está documentado que una exposición prenatal al dietilestilbestrol (DES) tiene elevado riesgo de producir malformaciones de útero, cérvix y trompas uterinas, e infertilidad, especialmente infertilidad uterina y tubárica. En modelos animales el daño epigenético alcanza a la tercera generación. La exposición al tabaco de madres fumadoras reduce el número de células del ovario en embriones/fetos. Los autores puntualizaron que los ovocitos no pueden sobrevivir si no están rodeados por las células foliculares, por lo que estas son trascendentales.

La exposición prenatal a plaguicidas como el DDT/DDE puede tener asociación inversa con la fecundabilidad. Por otro lado, la exposición del embrión/feto a los dibenzofuranos policlorados (PBC) puede tener inversa o positiva asociación con la fecundabilidad del producto femenino.

La adolescencia es otra época de la vida en la que la exposición a riesgos puede dañar la fecundabilidad. Se han encontrado niveles reducidos de la hormona antimulleriana (AMH) en aquellas jóvenes altas que fueron tratadas con estrógenos para detener su crecimiento. Este tratamiento resultó ser tóxico para los ovocitos y/o folículos (Baird, 2013).

## Tabaco, alcohol, cafeína y estrés

Se ha confirmado una relación directa entre el consumo de tabaco y la tasa de fecundabilidad, que repercute en la producción de estrógenos, hormonas que regulan la actividad ovulatoria, por lo que disminuye la reserva de óvulos y del número de folículos (Agarwal, Aponte-Mellado, Premkumar, Shaman, Gupta, 2012; Merritt, T., Mazela, y Merritt, A., 2013). En los hombres se puede presentar aumento de hasta 48% de leucocitos en el líquido seminal, sin contar que las EOR también aumentan y sobrepasan al 100%. Las EOR reaccionan con compuestos orgánicos, principalmente con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana del espermatozoide, este evento es llamado EO.

El consumo de alcohol por tiempo prolongado, aun cuando sea moderado, tiene consecuencias en la pubertad de las niñas, en su crecimiento óseo por daños al eje hipotálamo-hipofisario-ovario (Baird y Strassman, 2000). El alcohol conduce a la disminución en la reserva ovárica por eventos en cadena que comienzan con el aumento de los estrógenos y terminan en la reducción de la foliculogénesis e inhibición de la ovulación. En el hombre provoca atrofia testicular con reducción de los túbulos seminíferos y la muerte de espermatozoides (Acevedo, Manzanares, Manau, y Chávez).

La asociación entre el consumo de cafeína y la fertilidad es controversial; hay reportes que indican que solo disminuye la fertilidad 10% para consumidoras de muy altas concentraciones de cafeína (Baird y Strassman, 2000). Y hay otros estudios que indican que la cafeína afecta la fertilidad según la bebida en la cual se consume. Se ha podido determinar que tienen TPE más prolongados aquellas mujeres que consumen cafeína en refrescos que aquellas que la consumen en otras bebidas como el café, siempre y cuando la cantidad de cafeína sea de 300 + mgr/día (Hatch *et al.*, 2012).

Algunos de los efectos en las parejas que buscan la concepción son: la ansiedad, disminución de la autoestima, alteración en su relación con el entorno social y una mala relación de pareja que

repercute en un mal funcionamiento sexual, a esto se le llama estrés de la infertilidad. Este tipo de estrés actúa sobre los ejes hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) e hipotalámico-pituitario-gonadal (HPG) y sobre el sistema simpático-adrenal-medular. El eje HPA y las hormonas del estrés actúan sobre la hormona liberadora de gonadotropina, prolactina, LH y FSH. Las mujeres que están pasando por estas situaciones, al medirles, por medio de la saliva, indicadores bioquímicos del estrés (el cortisol y la alfa amilasa) alcanzan valores elevados (Veiga, Puccio y Tamburelli, 2013).

### **Exposición ocupacional y ambiental**

#### **Compuestos orgánicos persistentes y plaguicidas**

Los compuestos orgánicos persistentes (COP's) como las dibenzo-p-diosinas (PCDD), compuestos bifenilpoliclorados (PCB), éteres polibromados (PBDE), cloronaftalenos (PCNs) y el bisfenol A (BPA) (Gregoraszcuk y Ptak, 2013) tienen alta afinidad por los lípidos, propiedad química que les permite disolverse en tejidos grasos, lugar donde se bioacumulan. Tienen la capacidad de suplantar o inhibir las hormonas y actuar como disruptores endócrinos con efectos sobre la fertilidad humana (Arata de Bellabarba, 2011).

Los plaguicidas han ido cambiando con el paso de los años, tal como los organoclorados (OCs), que incluyen los compuestos bifenilpoliclorados (PCBs) y dioxina, compuestos menos volátiles que los COPs, pero igualmente bioacumulables y muy estables (propiedad química que hace difícil su eliminación del organismo) seguidos por los organofosforados (OFs) que han sustituido a los OCs. Los OFs son muy inestables, por lo que no se bioacumulan, sin embargo, tienen un severo nivel de toxicidad humana. Finalmente surgen los carbamatos que también pueden asociarse a la reducción de la fertilidad/esterilidad. Los COPs y los pesticidas tienen efectos en la fertilidad humana, pues afectan el desarrollo de la pubertad, el ciclo menstrual y el desarrollo folicular, actúan como disruptores

endócrinos; operan con diversidad química y funcional (Arata de Bellabarba, 2011; Gregoraszczyk y Ptak, 2011).

### **Óxido nitroso, mercurio y drogas neoplásicas**

La falta de normas de higiene en los consultorios odontológicos reporta la exposición a los vapores de mercurio de las amalgamas dentales y a los vapores de óxido nitroso liberado por algunos anestésicos utilizados en odontología. Estos pueden bloquear la secreción de la gonadotropina por el hipotálamo, interrumpiendo la ovulación y provocando trastornos en la función reproductiva.

En enfermería las drogas neoplásicas, al administrarse sin seguir las normas de seguridad, también se convierten en factores de riesgo laborales que pueden provocar subfertilidad (Baird, 2013; Rowland *et al.*, 1992).

### **Cambios de turno**

El cambio de turno en los trabajos provoca desequilibrio hormonal, por lo que ha sido señalado como probable riesgo laboral aunque de manera parcial y asociado a otras exposiciones como: metales pesados, solventes, pesticidas, sustancias químicas de limpieza, ftalatos, calor y ruido.

En general, han ido decreciendo las exposiciones riesgosas en los trabajos, gracias a la aplicación de las normas de seguridad e higiene, sin embargo, es difícil determinar los riesgos ocupacionales porque las trabajadoras que conciben fácilmente y a corta edad suelen abandonar el trabajo formal (Baird, 2013).

## **Estrés oxidativo y metales pesados**

El EO es un fenómeno que no solo ocurre con el humo del tabaco, sino también con otros elementos como metales pesados (Mallok, Martínez-Sánchez, Flores-Sánchez y Alonso-Rodríguez, 2011) y el consumo de alcohol (Baird y Strassman, 2000). El espermatozoide es especialmente susceptible al EO por su alto contenido de este tipo de ácidos grasos en su membrana. El peróxido de hidrógeno, la molécula reactiva que da origen al EOR oxidrilo, es el que más daño hace al espermatozoide porque fragmenta su DNA, disminuye su movilidad y, como altera la membrana, afecta la capacidad de fusión con el óvulo (Dai, Wang, y Qiao, 2015; Mallok *et al.*, 2001).

Los metales pesados como el plomo (Pb) inducen el EO, pero en este caso, es un EO sistémico que coincide con una disminución de antioxidantes en el líquido seminal, con el consecuente daño a los espermatozoides y anomalías en el aparato reproductor masculino (Mallok *et al.*, 2011). El efecto del Pb en la disminución de la fecundidad en la mujer es controversial, pero está asociado significativamente con el TPE en mujeres cuyas parejas han estado expuestas ocupacionalmente a él (Guerra-Tamayo *et al.*, 2003).

## **CONCLUSIONES**

El tiempo para embarazo (TPE), definido como el número de ciclos sin usar anticonceptivos que le toma a una pareja sexualmente activa, alcanzar una concepción reconocida, es un estimado de la probabilidad por ciclo, de obtener una concepción clínicamente detectable. Un incremento en el TPE puede indicar pérdidas reproductivas en diferentes etapas (gametogénesis, transporte de gametos, etcétera.)

El TPE constituye una excelente herramienta para la vigilancia epidemiológica en salud reproductiva, a nivel poblacional. Es poco invasivo, tiene buena sensibilidad, puede ser medido retrospectiva y prospectivamente. La metodología ha sido estandarizada y validada



en varias poblaciones. Los sesgos pueden disminuirse, controlarse y evaluarse. Los principales confusores han sido ampliamente evaluados y sobre todo, dan una información de la pareja que funciona como evento centinela, la cual enciende una alarma, un foco rojo, para señalar dónde y cómo profundizar, según sean las circunstancias, evitando el sesgo de género. Puede medirse en meses y no necesariamente en ciclos, lo cual mejora la validez de las respuestas, permite incluir en la valoración pérdidas muy tempranas, integra información de la pareja, incorpora efectos de una gran variedad de procesos biológicos, es capaz de detectar riesgos, independientemente del mecanismo biológico a través del cual puedan estar operando y, además, supera el problema de la dicotomía que presenta la definición de fertilidad, contraponiendo el concepto de fecundidad.

Aunque múltiples factores pueden afectar el TPE, como por ejemplo, características sociodemográficas, exposiciones ambientales, farmacológicas, estilos de vida, etcétera., que influyen en uno o en ambos integrantes de la pareja, esta medición, ubicada en el contexto de análisis, orienta y focaliza los pasos a seguir, tanto si se analiza con enfoque poblacional como clínico, ya que incluso puede evitar la realización de pruebas invasivas o al menos reorientar las mismas, al considerar a quienes conforman la pareja como un todo.

Es un excelente método de vigilancia epidemiológica en ambientes laborales, es una herramienta clínica y epidemiológica de gran valor, ya que no es invasivo ni costoso y beneficia tanto a hombres como mujeres para la detección oportuna de riesgos o exigencias que puedan alterar la fecundidad. Especialmente, en el caso de riesgos químicos para los cuales no existen marcadores de exposición crónica o subcrónica, como por ejemplo, la exposición a plaguicidas organofosforados.

Igualmente ocurre con la valoración de riesgo reproductivo de algunos estilos de vida; por ejemplo el hábito del tabaquismo, cuyo riesgo se centró durante muchos años en el estudio de este hábito en la madre. Hoy por hoy sabemos que los riesgos reproductivos también implican al padre si tiene este hábito (Dai, Wang y Qiao,

2015) y que afectan el TPE. Otros ejemplos incluyen la actividad física y la nutrición, por mencionar los más comunes.

Se recomienda utilizarlo en el primer embarazo para controlar algunos factores gineobstétricos, sin que ello obste para tenerlo en cuenta en embarazos subsecuentes.

Finalmente se considera que es una herramienta útil a nivel laboral, ambiental y clínico para vigilar a la población general en tiempo y espacio.

## REFERENCIAS

- Acevedo, B., Manzanares, M., Manau, D., y Chávez, M. (2012) Hábitos tóxicos y reproducción. Recuperado el 20 de junio de 2016 en [http://www.hvn.es/servicios\\_asistenciales/ginecologia\\_y\\_obstetricia/ficheros/curso2012\\_reprod\\_04\\_habitos\\_toxicos\\_dra\\_acevedo.pdf](http://www.hvn.es/servicios_asistenciales/ginecologia_y_obstetricia/ficheros/curso2012_reprod_04_habitos_toxicos_dra_acevedo.pdf)
- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A. & Gupta, S. (2012) The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 10:49. doi: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>
- Arata de Bellabarba, G. (2011) Contaminantes orgánicos persistentes (COPs): Qué son y cómo afectan el medio ambiente y la salud. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 9(2), 34-36. Recuperado en <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/33637/1/editorial.pdf>
- Baird D. D. (2013). Women's Fecundability and Factors Affecting It. In E. Inc. (Ed.), *Women and Health* (pp. 193 - 207).
- Baird, D. D., Wilcox, A. J., & Weinberg, C. R. (1986). Use of time to pregnancy to study environmental exposures. *Am J Epidemiol*, 124(3), 470-480. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3740046>
- Baird, D. D. & Strassman, B. (2000). Women's fecundability and factors affecting it. In *Women and Health*, M. B Goldman. & M. C Hatch,. (Eds). New York: Academic Press, 126-137. Recuperado en <https://sites.lsa.umich.edu/bis/wp-content/uploads/sites/171/2014/09/Womens-Fecundability-and-Factors-Affecting-It.pdf>
- Bonde, J. P., Ernst, E., Jensen, T. K., Hjollund, N. H., Kolstad, H., Henriksen, T. B., ... & Skakkebaek, NE. (1998). Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352(9135), 1172-1177. doi:10.1016/S0140-6736(97)10514-1

- Brugo-Olmedo, S., Chillik, C., y Kopelman, S. (2003). Definición y causas de la infertilidad. *Revista colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54(4), 227-248. Recuperado en <https://revista.fecolsog.org/index.php/rcog/article/view/567/614>
- Carlson, B. M. (2014). *Embriología Humana y Biología del Desarrollo* (5ª ed.). Madrid: S.A. Elsevier España.
- Colin, A., Barroso, G., Gómez-López, N., Duran, E. H., & Oehninger, S. (2010) The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 94(7), 2609-2614. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.04.043>
- Dai, J. B., Wang, Z. X., & Qiao, Z. D. (2015) The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J Androl*, 17(6), 954-960. Recuperado en <http://www.ajandrology.com/article.asp?issn=1008-682X;year=2015;volume=17;issue=6;spage=954;epage=960;aulast=Dai>
- Garry, V. F., Harkins, M. E., Erickson, L. L., Long-Simpson, L. K., Holland, S. E., & Burroughs, B. L. (2002). Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environ Health Perspect*, 110 Suppl 3, 441-449. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1241196/pdf/ehp110s-000441.pdf>
- Gini, C. (1977). First Investigations on the Fecundability of a Woman. In *Mathematical Demography. Biomathematics 6*. (pp. 367-371). Springer Berlin Heidelberg doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-81046-6\\_40](https://doi.org/10.1007/978-3-642-81046-6_40)
- Gregoraszczyk, E. L. & Ptak, A. (2013) Endocrine-Disrupting Chemicals: Some Actions of POPs on Female Reproduction. *Int J Endocrinol*, 2013, 828532. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/828532>
- Guerra-Tamayo, J. L., Hernández-Cadena, L., Téllez-Rojo, M. M., Mercado-García, A. del S., Solano-González, M., Hernández-Avila, M. y Hu, H., (2003). Exposición al plomo y su relación con el tiempo requerido para embarazo. *Salud Pública de México*, 45, 189-195. Recuperado en [https://scielosp.org/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0036-36342003000800004&lng=en&nrm=iso&tlng=es](https://scielosp.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0036-36342003000800004&lng=en&nrm=iso&tlng=es)
- Harris, L. A., & Selgrade, J. F. (2014). Modeling endocrine regulation of the menstrual cycle using delay differential equations. *Math Biosci*, 257, 11-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2014.08.011>
- Hatch, E. E., Wise, L. A., Mikkelsen, E. M., Christensen, T., Riis, A. H., Sorensen, H. T. & Rothman, K. J. (2012) Caffeinated beverage and soda consumption and time to pregnancy. *Epidemiology*, 23(3), 393-401. doi: <https://dx.doi.org/10.1097%2FEDE.0b013e31824cbaac>
- Hofny, E. R. M., Ali, M. E., Abdel-Hafez, H. Z., Kamal, E. E.-D., Mohamed, E. E., El-Azeem, H. G. A. & Mostafa T. (2010). Semen parameters and hormonal

- profile in obese fertile and infertile males. *Fertility and sterility*, 94(2), 581-584. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.085>
- Idrovo, Á. J., y Sanín, L. H. (2007). Resultados adversos en la procreación en mujeres trabajadoras en la floricultura colombiana: un resumen de la evidencia mediante metanálisis. *Biomédica*, 27(4), 490-497. Recuperado en <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v27n4/v27n4a04.pdf>
- Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M. & Dey, S. K. (1997). Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 91(2), 197-208. doi: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80402-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80402-X)
- Lucía, A., Chicharro, J. L., Pérez, M., Serratos, L., Bandrés, F., & Legido, J. C. (1996). Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *Journal of Applied Physiology*, 81(6), 2627-2636. Recuperado en <http://jap.physiology.org/content/81/6/2627>
- Lundsberg, L. S., Pal, L., Garipey, A. M., Xu, X., Chu, M. C., & Illuzzi, J. L. (2014). Knowledge, attitudes, and practices regarding conception and fertility: a population-based survey among reproductive-age United States women. *Fertility and sterility*, 101(3), 767-774. e762. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.006>
- Mallok, A., Martínez-Sánchez, G., Flores-Sánchez, R. M. a., & Alonso-Rodríguez, C. Á. (2011) Relación entre indicadores clínicos del espermograma y variables redox en infertilidad masculina. *Revista Cubana de Farmacia*, 45, 361-379. Recuperado en [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152011000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152011000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Merritt, T., Mazela, J., & Merritt, A. (2013) Tobacco smoking and its consequences on reproductive health: the impact of a lifestyle choices including cigarette smoke exposure on fertility and birth defects. *Przegl Lek*, 70(10), 779-783. Recuperado en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24501794>
- Mihm, M., Gangooly, S., & Muttukrishna, S. (2011). The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci*, 124(3-4), 229-236. Recuperado en [http://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0378-4320\(10\)00414-8/pdf](http://www.gynecologiconcology-online.net/article/S0378-4320(10)00414-8/pdf)
- Puerta-Suárez, J., Giraldo, M., Cadavid, Á. P., y Cardona-Maya, W. (2014). Infecciones bacterianas del tracto reproductivo masculino y su papel en la fertilidad. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 79(3), 209-217. Recuperado en <http://www.revistasochog.cl/files/pdf/ARTICULORevision010.pdf>
- Rowland, A. S., Baird, D. D., Weinberg, C. R., Shore, D. L., Shy, C. M., & Wilcox, A. J. (1992). Reduced fertility among women employed as dental assistants exposed to high levels of nitrous oxide. *New England Journal of Medicine*, 327(14), 993-997. Recuperado en <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199210013271405>

- Sapra, K. J., McLain, A. C., Maisog, J. M., Sundaram, R., & Louis, G. M. B. (2016). Successive time to pregnancy among women experiencing pregnancy loss. *Human Reproduction*, 29(11), 2553-2559. <https://doi.org/10.1093/humrep/du216>
- Schliep, K. C., Mitchell, E. M., Mumford, S. L., Radin, R. G., Zarek, S. M., Sjaarda, L., Schisterman E. F. (2016). Trying to conceive after an early pregnancy loss: An assessment on how long couples should wait. *Obstetrics & Gynecology*, 127(2), 204-212. doi: 10.1097/AOG.0000000000001159
- Sermondade, N., Faure, C., Fezeu, L., Shayeb, A. G., Bonde, J. P., Jensen, T. K., ... & Czernichow, S. (2013) BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 19(3), 221-231. doi:10.1093/humupd/dms050
- Slama, R., Eustache, F., Ducot, B., Jensen, T. K., Jorgensen, N., Horte, A., I., ... & Jouannet, P. (2002). Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod*, 17(2), 503-515. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/17.2.503>
- Veiga, M. C., Puccio, M. C., y Tamburelli, V. (2013) ¿Qué relación existe entre estrés, ansiedad e infertilidad. *Reproducción*, 28(3), 79-89. Recuperado en [http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2013/vol\\_3/revision.pdf](http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2013/vol_3/revision.pdf)
- Wildenschild, C., Riis, A. H., Ehrenstein, V., Hatch, E. E., Wise, L. A., Rothman, K. J., Sorensen, H. T. & Mikkelsen, E. M. (2015) A prospective cohort study of a woman's own gestational age and her fecundability. *Hum Reprod*, 30(4), 947-956. doi: 10.1093/humrep/dev007
- Yeh, C. H., Chen, P. C., Chen, C. H., Hsu, C. F., Huang, R. L., Ding, D. C. & Chi, T. Y. (2016). Platelet-Derived Growth Factor in the Ovarian Follicle Attracts the Stromal Cells of the Fallopian Tube Fimbriae. *PLoS One*, 11(7), e0158266. doi:10.1371/journal.pone.0158266

---

## CAPÍTULO 4

### **SALUD REPRODUCTIVA EN FAMILIAS AGRICULTORAS YUCATECAS: MODELO DE ABORDAJE MEDIANTE INVESTIGACIÓN-ACCIÓN PARTICIPATIVA**

*Norma Elena Pérez Herrera, María Teresa Castillo Burguete,  
Mayra Vera Avilés*

#### **INTRODUCCIÓN**

En este trabajo se muestra la vinculación de la Toxicología con la Ecología Humana en la construcción de la espiral formada con la investigación científica (IC) e investigación-acción Participativa (IAP),<sup>1</sup> abordando la salud reproductiva y la exposición a plaguicidas de los agricultores del municipio de Muna en el estado de Yucatán y de sus parejas, quienes fueron parte fundamental de la espiral.

En la IC existen medios convencionales para estudiar los efectos de los plaguicidas en la salud humana y para difundir sus resultados; no obstante, con frecuencia el conocimiento que se genera no se comunica de forma suficiente a la población que participó en producirlo, aun cuando este tipo de investigación se considera aplicada. Debido a los efectos que se han documentado en esos agricultores

---

<sup>1</sup> Agradecemos el apoyo otorgado por el Prodep (antes Promep).

y sus familias, se considera necesario que esta población no solo conozca tal información, sino que también participe de manera activa y reflexiva tanto en la detección y atención de sus problemas de salud como en la generación de conocimiento y su aplicación para la búsqueda de soluciones. Este proceso puede llevarse a cabo mediante el diálogo y el trabajo conjunto de científicas(os) y la comunidad agricultora mediante la IAP, de manera que entre ambas partes se construya la espiral.

El objetivo de este capítulo es mostrar un modelo empleado para la producción de conocimiento mediante la IC, que responde a las necesidades de la población y le informa los resultados obtenidos a través de la espiral de la IAP para su apropiación y aplicación en la prevención de daños a la salud derivados de la exposición a plaguicidas.

En 2005 se inició un estudio, que culminó en 2009, para evaluar el efecto de la exposición a plaguicidas en la calidad de semen y el papel de polimorfismo del gen Q192R de la paraoxonasa 1. En el estudio participaron 36 agricultores. La espiral de la IAP se inició con un taller; ahí los asistentes analizaron los resultados, externaron opiniones y su preocupación por su salud y la de sus familias, especialmente de sus esposas; plantearon la necesidad de evaluar el riesgo de exposición que ellas podrían tener porque lavan la ropa contaminada con plaguicidas que ellos usan en las labores agrícolas. Los agricultores contribuyeron a la espiral de investigación haciendo el análisis propio de la IAP y también proponiendo otros problemas que se retomaron después en la IC. En 2011 se atendió la solicitud de los agricultores participantes en el grupo de IAP y se realizó un estudio para conocer el escenario de exposición paraocupacional a plaguicidas de sus parejas y sus efectos en la reproducción. Ese mismo año, se realizó un Taller 2 (T2) con la participación de 52 mujeres, entre esposas y familiares, quienes conocieron y analizaron los resultados, trazando colectivamente una nueva vuelta de la espiral para solucionar sus problemas.

Esta vinculación de IC e IAP repercute en un beneficio triple: 1) informar a las y los sujetos de estudio, buscando acciones



pertinentes a sus circunstancias, 2) responder a sus necesidades y 3) avanzar en el conocimiento científico.

## MARCO TEÓRICO

Estudios realizados en comunidades agrícolas de Yucatán tienen entre sus objetivos más generales evaluar los efectos de las actividades humanas en el ambiente y en la salud de sus moradores (Pérez-Herrera *et al.*, 2008, 2008<sup>a</sup>). Avanzar en el conocimiento de tales efectos da pautas para implementar cambios que pueden ser realizados por instituciones o personas y, dependiendo de ello, la población sujeto de la investigación se verá beneficiada de forma temprana o más tardía. Un factor importante en este proceso es la autoprotección que pueden ejercer los trabajadores para atenuar los efectos sobre su salud derivados de los riesgos en sus actividades laborales.

De ahí que el objetivo de este trabajo sea presentar los resultados de la investigación realizada en los talleres con los agricultores y con mujeres de la localidad. Se continuó la espiral de IAP donde las y los involucrados conocen los resultados de los estudios, los analizan y generan ideas para solucionar sus problemas.

Establecer un diálogo con agricultores, más allá de que solo proporcionen información a las(os) investigadores profesionales para sus indagaciones, hace posible identificar un problema de manera conjunta para su estudio en la espiral de investigación, responder a las necesidades del grupo e incidir para atenuar sus conductas de riesgo.

Una meta que varios estudios se han propuesto, ha sido involucrar activamente a la población con la cual se trabaja, especialmente cuando la salud de la población se ve afectada (Cook, 2008). Por ello, para los trabajadores agrícolas que usan plaguicidas, es fundamental conocer y analizar los resultados de los estudios sobre su salud, mantenerse informados y ser capaces de nutrir

la toma de decisiones individual, grupal y familiar. Para lograrlo, los fundamentos de la IAP resultan esclarecedores porque, según la contribución de Bradbury (2010, p. 93), la orientación para crear conocimiento se basa en el contexto de la práctica y requiere que quienes investigan trabajen con la población participante. De forma distinta a la ciencia social convencional, la IAP no se propone solamente conocer la situación social, sino también los efectos que tiene para el cambio como base para generar conocimientos y empoderar a los(as) participantes.

Greenwood y Levin (1998, p. 4) indican que en un proceso de IAP las(os) investigadores profesionales y las personas participantes de las comunidades o grupos definen los problemas o están de acuerdo en examinarlos, generando conocimiento relevante, además de aprender y poner en práctica técnicas de investigación social, así como los resultados de las acciones basados en la forma en que aprendieron. Por ello, para Reason y Bradbury (2001, p. 1) la IAP no inicia con el deseo de cambiar a otros de forma externa, sino orientando y yendo al cambio en conjunto. Greenwood y Levin (1998, p. 6) sostienen que se trata de analizar la situación social y promover cambios en ella, incrementando la habilidad de involucrar a la comunidad u organizaciones para controlar su destino de forma más eficiente e incrementar su capacidad para hacerlo.

En términos generales Castillo, Viga y Dickinson (2008) identifican a dos grupos de participantes: los *facilitadores*, que son integrantes de la comunidad o grupo dispuesto a realizar los talleres y reuniones para analizar la información por medio de la IAP, quienes se comunican con el resto de sus compañeros que no participan en el grupo; y las(os) *acompañantes*, que en este caso son parte de un equipo de investigación dispuesto a trabajar con los *facilitadores* para llevar a cabo el proceso de IAP. Los autores mencionados indican que se pueden seguir varias etapas: 1) convocatoria para participar e integrar el grupo de *facilitadores*; 2) entrenamiento de estos en la metodología de trabajo; 3) identificación y jerarquización de los problemas considerados más relevantes con vistas a encontrar

su solución; 4) análisis y acción para abordar el problema buscando el diseño de propuestas de acción; 5) evaluación del trabajo efectuado; 6) festejo por el trabajo realizado; 7) reinicio del proceso en la etapa tres, para abordar otro problema o una nueva fase del ya analizado.

Stringer (1996) señala un procedimiento central para realizar la búsqueda de soluciones: ver-analizar-actuar. En la primera fase se reúnen todos los datos concernientes al problema, sus causas y consecuencias; en la segunda se analiza y discute la información de la fase previa y en la tercera se estudian y diseñan posibles acciones de acuerdo con las circunstancias y recursos del grupo. Un procedimiento similar se siguió durante el trabajo realizado con los agricultores y sus esposas, nutriendo también el proceso con aspectos provenientes de la investigación científica relacionada con la toxicología de plaguicidas.

Usar plaguicidas en la agricultura es una práctica mundial común. Yongbo *et al.* (2012) muestran que de los 140 países que emplearon insecticidas en el periodo de 1993 a 2009, México ocupó el tercer lugar entre los 50 países que usan más de mil toneladas anuales, al registrar un consumo de 25 000 ton después de Estados Unidos y la India en el primero y segundo lugares, con 96 000 y 34 000 ton respectivamente.

La situación es más crítica para México si se relaciona el consumo de plaguicidas con su superficie, aun cuando no se aplican en todo el territorio nacional (Banco Mundial, 2012). La superficie (km<sup>2</sup>) reportada por país en 2012 fue: EUA 9 831 510, India 3 287 260 y México 1 964 380 que, divididos entre la cantidad de plaguicidas utilizada (Yongbo *et al.*), arrojan un promedio de plaguicidas por km<sup>2</sup> de: EUA 0.0097645, India 0.0103429 y México 0.0127266, ocupando el primer lugar.

En EUA y la India los efectos de utilizar plaguicidas se estudian como parte de los riesgos de la agricultura moderna sobre la salud de la población (Cook, 2008; Sarkar, Aronson, Patil, Hugar y van-Loon, 2012). En México la cantidad de plaguicidas aplicada en la

agricultura muestra una situación grave por lo que desde hace dos décadas se planteó la necesidad de regular su uso (Ortega-Ceseña, Espinosa-Torres, y López-Carrillo, 1994). Sin embargo, conocer brevemente los antecedentes de la agricultura en el país, como parte de Mesoamérica, área cultural que Kirchoff (1967), Romero-Contreras y Avila-Ramos (1999) definen extendida hacia Sudamérica, ayuda a entender la forma actual de practicarla.

En Yucatán, parte de Mesoamérica, desde la época prehispánica se usaba el sistema de roza, tumba y quema para la agricultura de temporal, pero entre 1960 y 1979 el gobierno impulsó programas para la agricultura intensiva. Implementaron los planes *Chac, Tabi y Tabi-Muna*, como parte de la *revolución verde* en la región, provocando cambios en la forma de cultivar y en la población que la realizaba (Eastmond, 1991; Muñoz-Cervantes, 2006). Ahora se usan agroquímicos, semillas mejoradas, cierta maquinaria y riego. En Muna, municipio donde se llevó a cabo este estudio, los agricultores experimentaron las consecuencias de esta forma de producción (Muñoz-Cervantes, 2006).

Los agricultores de Muna, y de Yucatán en general, manejan plaguicidas y están expuestos a sus efectos; las repercusiones en su salud y la de sus familiares comenzaron a ser evaluadas desde hace casi dos décadas (Alvarado-Mejía, Cobos-Gasca, y González-Navarrete, 1994; Pérez-Herrera *et al.*, 2008, 2008a). Las consecuencias del uso de plaguicidas se ven en la salud de la población expuesta, también en la contaminación del acuífero (Grael-Castro, Pacheco-Medina, y Coronado-Peraza, 2009; Metcalfe *et al.*, 2011; Polanco-Rodríguez *et al.*, 2011), en la calidad del agua para regar (Delgado *et al.*, 2010) y en la leche materna humana para alimentar a las y los bebés (Rodas-Ortiz *et al.*, 2008).

El manejo de plaguicidas es un problema complejo que impacta en diversas áreas, Barraza, Jansen, Van Wendel de Joode y Wesseling, (2011) estudiaron en Costa Rica, la exposición de trabajadores, mujeres y niñas(os) a los plaguicidas en los cultivos de plátano y plátano macho, así como la percepción que tenían del

riesgo al que se exponen; señalaron factores económicos, políticos, ambientales, de salud y conductuales. La exposición a plaguicidas afecta a países como México, pero también a otros países en el mundo.

Para los trabajadores expuestos, parte de las repercusiones en su salud pueden ser evidentes y expresarse en intoxicación aguda, mareo, vómito y pérdida de conciencia, mala calidad del semen (Padungtod *et al.*, 1999; Pérez-Herrera *et al.*, 2008), y otras alteraciones en la salud reproductiva (Quintanilla-Vega, Pérez-Herrera y Piña-Guzmán (2008); Quintanilla-Vega, Pérez-Herrera y Rojas-García (2010). Lo cierto es que no todos los efectos son percibidos por las personas afectadas.

## DESARROLLO METODOLÓGICO Y RESULTADO

### Zona de estudio

El municipio de Muna está a 53 km de Mérida, capital del estado de Yucatán. En 2010 el municipio tenía 12 336 habitantes, mayormente de ascendencia maya-yucateca (INEGI, 2010), que hablan la lengua maya, intercalada con español y mantienen prácticas culturales como el *Hanal Pixan* (comida para las almas) para honrar cada año a sus ancestros, entre finales de octubre y el mes de noviembre. En Muna se encuentran 103 de las 833 unidades agrícolas que usan plaguicidas en el estado (INEGI, 2010) en las que se cultiva: chile habanero (*Capsicum Chinense Jacq.*), papaya maradol (*Carica papaya*), jitomate (*Solanum lycopersicum L.*), maíz (*Zea mays L.*), sandía (*Citrullus lanatus*) y naranja dulce (*Citrus sinensis L.*).

Alvarado *et al.* (1994) estudiaron los insecticidas y herbicidas de mayor uso entre los horticultores de Muna y las implicaciones que tienen en su salud y en el ambiente. Reportaron daños en el ambiente e intoxicaciones agudas y crónicas en las personas. Las

intoxicaciones fueron atendidas en el centro de salud de la localidad o en Mérida, por médicos particulares o de instituciones públicas.<sup>2</sup>

Observaciones realizadas en la localidad e información obtenida de pláticas con agricultores confirman que para cultivar sus parcelas se tienen que desplazar del centro de la localidad hacia tierras aledañas. Lo hacen en bicicleta, triciclo o camioneta, llevando consigo parte de los utensilios y materiales que usan para su trabajo. Ellos mismos aplican los plaguicidas con bomba manual tipo mochila y al terminar sus labores, se trasladan de regreso a sus hogares, actividad que repiten diariamente o según las necesidades del ciclo agrícola. Las esposas, hijas e hijos se quedan en el pueblo, atendiendo sus labores domésticas, entre ellas lavar la ropa que usaron sus esposos o familiares para fumigar las parcelas.

### **Modelo de IAP y vinculación entre la Ecología Humana y la Toxicología para realizar investigación científica**

Para profundizar en el conocimiento sobre los posibles efectos de los plaguicidas en la salud humana (calidad de semen y síntomas neurológicos relacionados con el polimorfismo de genes que codifican enzimas metabolizadoras de plaguicidas), en 2005 se planteó un proyecto de investigación, que a su vez fue el inicio de la colaboración entre tres investigadores y cinco estudiantes del área de Toxicología con la de Ecología Humana de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) y del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav).

Desde el inicio del proyecto se contó con la colaboración de una habitante de la comunidad, quien fue pieza clave para la introducción del grupo de trabajo a la misma. El proyecto se presentó a las autoridades de gobierno (presidente municipal), agrarias

---

<sup>2</sup> Comunicación personal de tres agricultores de la localidad de 27, 32 y 63 años de edad respectivamente.

(comisario ejidal), de salud (regidora de salud) y religiosas (sacerdote); con el fin de difundir el estudio e invitar a los agricultores a colaborar en él se dio a conocer a la población en diversas reuniones a las que acudieron hombres y mujeres. Se estima que aproximadamente 254 pobladores del sexo masculino se enteraron del estudio; 100 agricultores en total aceptaron participar y firmaron el consentimiento informado (tabla 1).

Los participantes tenían en promedio  $48 \pm 15$  años de edad, 90% eran casados y 82% tenían hijas(os); sus esposas tenían en promedio  $43.97 \pm 14.56$  años de edad, con una media de tres hijas(os). En cuanto al manejo de plaguicidas, 84% de los agricultores declaró usarlos y tener en promedio 20 años dedicados a la agricultura.

Un total de 56 agricultores respondieron el cuestionario estructurado mediante entrevista y donaron las muestras de sangre y semen. Se realizaron estudios de biometría hemática, perfil de lípidos y examen general de orina. Al concluir la investigación, personal calificado informó a cada agricultor participante, de forma privada e individualizada, los resultados de los análisis clínicos que le fueron practicados.

Se diseñaron los talleres y los materiales necesarios para presentar los resultados de manera grupal a todos los participantes en el estudio. Se trataba de analizar esos resultados y planear, a través de IAP, posibles cambios en su situación. El grupo de agricultores que respondió a la convocatoria para el primer taller T1 mostró características sociodemográficas similares a las de la totalidad de los participantes del estudio: en su mayoría tiene esposa e hijas(os) viviendo en el seno familiar, aplica plaguicidas a los cultivos y declaró tener cerca de dos décadas de trabajar como agricultor (datos no mostrados).



**Tabla 1. Características biológicas y sociodemográficas de los agricultores (N =100).**

Parámetro	Valor
Edad (años), promedio $\pm$ desviación estándar	48.21 $\pm$ 15.47
Índice de masa corporal (kg/m <sup>2</sup> ), mediana (rango)	27.23 (20.90 - 41.78)
Normal	23
Sobrepeso	49
Obesidad	27
Obesidad extrema	1
Fumador (%)	35
Número de cigarrillos/día, mediana (rango)	2 (1-10)
Consumo de alcohol (%)	73
Casado (%)	90
Edad (años) de la pareja, promedio $\pm$ desviación estándar	43.97 $\pm$ 14.56
Casado con hijas(os) (%)	82
Número de hijas(os), mediana (rango)	3 (1-7)
Escolaridad (años), mediana (rango)	6 (0-16)
Uso de plaguicidas (%)	84
Años de trabajar en la agricultura, mediana (rango)	20 (1-70)

Fuente: Elaboración propia.

Para complementar el criterio de reciprocidad con los agricultores y conocer su punto de vista, primero se les presentaron los resultados de los estudios de manera individual y después en los talleres como resultados generales. Ese fue el inicio de un proceso de análisis y reflexión colectivo, a través de la IAP (Fals-Borda y Rahman, 1991; Reason y Bradbury, 2001; 2008).

A partir del taller de devolución y reflexión de resultados con los agricultores, surgió de ellos la necesidad de averiguar sobre la salud de sus parejas, misma que el equipo de investigación reconoció como significativa, dando lugar a la iniciativa conjunta

comunidad-academia de realizar un nuevo estudio con mujeres de la comunidad. Para retomar el contacto con la comunidad y con el grupo de interés se propuso una estrategia diferente a la aplicada con los agricultores, puesto que las mujeres tienen una dinámica distinta, por lo tanto, considerando que ellas desempeñan tradicionalmente un rol de cuidadoras de la salud de la familia, se decidió abrir el canal de vinculación mediante la clínica rural y las autoridades municipales de salud. Por conducto de algunas mujeres que participaban en la clínica rural se comenzó la técnica de muestreo de bola de nieve (Romero, Rodríguez, Durand-Smith, y Aguilera 2003), identificando mujeres informantes clave en el sector salud para reconocer a otras pertenecientes a familias agrícolas y, por conducto de ellas, llegar a más mujeres del mismo grupo. Este medio de contacto facilitó el acceso a las actividades de la comunidad, como festivales y fiestas tradicionales, a través de las cuales se mantuvo contacto con todas ellas durante el estudio: muestreo, encuestas, entrevistas y devolución de resultados en los talleres.

## **Entrevistas**

Después de realizado el T1 con los agricultores, se efectuaron entrevistas semiestructuradas con cuatro interlocutores clave para conocer sus opiniones sobre la situación del grupo y su actividad productiva. Dos de los entrevistados además tenían cargos político-administrativos a nivel municipal, uno relacionado con asuntos agrarios, otro como director de Desarrollo Rural Municipal, y un tercero, representaba a una asociación civil que agrupa a 36 unidades agrícolas, y había laborado con investigadores de una institución gubernamental que trabaja sobre producción agrícola.

La grabación de las entrevistas duró en total 5.08 horas, la más corta fue de 25 minutos y la más prolongada de 2.30 horas. Fueron transcritas e impresas para analizar los contenidos conceptuales de

las respuestas (Bernard, 1995). Las notas de la observación participante tomadas durante los talleres, y de lo expresado directamente por los participantes en las sesiones plenarias, se transcribieron a versión digital y se analizó el contenido de los temas y respuestas dadas (Bernard, 1995; Mayan, 2001). Se complementó la información con entrevistas semiestructuradas al regidor municipal de salud, a un agricultor de la localidad, jubilado después de trabajar como técnico en un instituto nacional de investigación agrícola, y a otro agricultor de la localidad, los tres considerados informantes calificados o interlocutores clave. Las entrevistas fueron cruciales para obtener opiniones sobre el uso de los plaguicidas en la agricultura y los efectos que conocen a través de su experiencia como trabajadores y moradores de la localidad.

Para los talleres las fases fueron: 1) preparación, 2) desarrollo, 3) evaluación de resultados de cada actividad y de los talleres realizados con los agricultores. Tuvieron el siguiente desarrollo:

### ***1) Preparación***

Se diseñaron invitaciones personalizadas (T1) que fueron entregadas a los agricultores en sus casas y también a las mujeres invitadas al T2. Se les pidió llevar la invitación el día del evento, como elemento para evaluar esta estrategia que pretendía favorecer la asistencia. La sede de cada evento fue la comisaría ejidal, bien conocida por los participantes; se planeó que su duración fuera de 90 minutos. En el diseño, elaboración y presentación de los resultados del estudio se empleó un lenguaje coloquial, ilustrando con imágenes y carteles, tanto como fue posible.

Los resultados presentados con respecto a la salud reproductiva de los agricultores expuestos a plaguicidas, muestran alteraciones en la calidad de semen y el papel del polimorfismo de la para-oxonasa 1 (gen PON1Q192R), en la susceptibilidad a estos efectos. La morfología y viabilidad espermáticas, así como el volumen del eyaculado y la integridad del ADN de los espermatozoides fueron

los parámetros con mayor afectación. El total de los agricultores presentó alteraciones en la morfología espermática, principalmente en la cabeza del espermatozoide; 46% tuvo un volumen de eyaculado menor al de referencia (1.5 ml) que establece la OMS (2002), la motilidad espermática estuvo por debajo del valor de referencia (50% de espermatozoides móviles) en 31% de los participantes; finalmente, 88% de los agricultores tuvo alteraciones en la integridad del ADN de los espermatozoides (mayores al 10% establecido como valor de referencia por Sakkas *et al.*, 1996). Respecto al papel del polimorfismo de PON1Q192R, la motilidad y viabilidad espermáticas disminuyeron con el incremento de la exposición a plaguicidas organofosforados (OF), mientras que la integridad del ADN de los espermatozoides incrementó con la exposición a OF, únicamente en los agricultores homocigotos del alelo 192RR del gen PON1Q192R (Pérez-Herrera *et al.*, 2008).

## **2) Desarrollo**

Los talleres tuvieron cinco fases: 1) registro de asistentes y bienvenida 2) presentación de resultados a los participantes 3) análisis de preguntas en pequeños grupos 4) presentación de opiniones en reunión plenaria 5) convivio y despedida.

En el caso del taller con las mujeres, como suele ser común que al salir a reuniones lleven a sus hijas e hijos más pequeños (Castillo-Burguete *et al.*, 2008), se prepararon actividades específicas para ellos y estuvieron atendidos por personal del proyecto. De esta manera las madres se concentraron en el desarrollo del taller, sin preocuparse por cuidarles.

## **3) Evaluación de resultados de los eventos**

Se evaluaron los resultados de cada taller para identificar aciertos y fallas en su organización y desarrollo, valorando la respuesta a la convocatoria reflejada en la asistencia de las y los participantes.

Para ordenar sus opiniones, estas se revisaron, analizaron y agruparon según su contenido (Bernard, 1995). El trabajo se centró en las respuestas de los participantes inmediatamente después de haberles presentado los resultados, en sus intervenciones en la discusión en pequeños grupos y en las presentaciones plenarias.

En el T1 los agricultores trabajaron sobre: 1) la identificación de prácticas de protección ante el uso de plaguicidas para no resultar tan afectados, 2) su interés por conocer si los plaguicidas afectan al resto de su familia y de qué manera; 3) su disposición para continuar participando en otra fase del estudio.

## **Los talleres**

### ***1) Prácticas de protección para no resultar tan afectados al usar “líquidos”***

Los agricultores se refirieron a los plaguicidas como “líquidos” y así se les llamó en los temas y preguntas del T1. Para el debate se dividieron en siete grupos. La observación participante realizada durante el evento muestra que dialogaban de forma animada, opinaban, diferían o expresaban su acuerdo con alguna otra opinión y se mantenían activos en el proceso; a veces preguntaban alguna duda a quienes habían hecho las presentaciones. Los resultados de las opiniones en cada grupo fueron presentados en reunión plenaria, donde expresaron de forma categórica que para realizar su trabajo como agricultores no pueden dejar de usar “líquidos”. Los agricultores aseguraron conocer varias prácticas de protección y todos los grupos reconocieron la importancia de usar equipo de protección personal, como guantes, lentes, botas y cubreboca. Usar ropa adecuada, destinada solo para fumigar y bañarse después de las aplicaciones fueron algunas de las medidas de protección externas por cuatro de los siete grupos de agricultores.

Los integrantes de un grupo expusieron que algunas prácticas comunes entre los agricultores como ingerir alimentos en su lugar de

trabajo o fumar mientras realizan sus actividades ponen en riesgo su salud. Los asistentes explicaron que no deben comer, beber líquidos ni fumar cuando fumigan como medida de protección para evitar intoxicaciones. En otro grupo se discutió la importancia de manejar de forma correcta los “líquidos”, sin entrar en mayores detalles de lo que implica “manejar de forma correcta”; otro más destacó que es necesario aplicarlos teniendo en cuenta la dirección en la que corre el aire para evitar rociarse a sí mismos.

Estos resultados expresados en el taller contrastan con los de las encuestas realizadas en 2005. Los trabajadores agrícolas usan ropa exclusiva cuando aplican los “líquidos”, la cual es lavada en casa por sus esposas, junto con la que usa la familia. La ropa impregnada con plaguicidas representa un riesgo de exposición para sus esposas y para toda la familia, pero principalmente para ellas. La forma de lavar es muy importante, 53% la lava a mano, tocando el agua con los plaguicidas. Solo 20% de las familias lava la ropa en lavadoras automáticas, pero 27% la lava en lavadora manual, haciendo contacto con el agua y las ropas impregnadas con pesticidas. El riesgo de exposición de las esposas está presente, pero para 46% de los agricultores el riesgo no es solamente para sus esposas sino para toda su familia porque en los hogares se almacenan los botes de pesticidas. Esto disminuye el riesgo de perderlos en sus áreas de trabajo, pero incrementa el peligro para la familia que comparte la casa.

## ***2) Interés por saber si los “líquidos” afectan al resto de su familia y de qué manera***

De los siete grupos, cinco expresaron de forma tácita su interés por conocer si los “líquidos” que usan para realizar sus labores agrícolas afectan a su familia; les preocupa su bienestar. Identifican claramente que la ropa que usan para fumigar es un factor de riesgo para su familia, por ello en cinco de los grupos indicaron que se debe lavar por separado.

En otros grupos mencionaron la importancia de evitar el contacto con los “líquidos”, no almacenarlos en la casa ni con alimentos. En un grupo se discutió un aspecto de suma importancia, que etiquetaron como *emocional* y que al presentarlo en plenaria llamó la atención de los demás participantes. Uno de los agricultores lo explicó de la siguiente manera:

Cuando termino mi trabajo me pongo a pensar que ya voy a regresar a mi casa, pero no quiero regresar. Bueno sí quiero, pero lo pienso, porque allá está mi familia, mi esposa y quiero estar con ellos. Pero sé que cuando llegue y me acerque a mi esposa me va a decir: “apestas a esos líquidos” y es verdad, esos líquidos apestan. Aunque yo me bañe bien y cambie mi ropa, el olor de los líquidos no se quita. Considero a mi esposa, pobrecita, tiene razón, pero yo también quiero acercarme a ella, estar con ella; quiero estar con mi familia, pero me reciben así. Por eso lo pienso cuando termino mi trabajo, que ya voy a ir a mi casa. Creo que también ella lo ha de pensar, que ya voy a regresar.

Este aspecto requeriría ser estudiado para conocer las implicaciones que el uso de los plaguicidas tiene en los cuerpos y la salud de los agricultores y sus familias, así como las repercusiones emocionales en los estados de ánimo y las relaciones familiares.

### ***3) Disposición para continuar participando en otra fase del estudio.***

En todos los grupos del taller, la respuesta de los agricultores para participar en los estudios posteriores fue afirmativa, los motivos que expresaron van en orden: la mayor parte quiere conocer los daños en la salud y propuestas para reducir riesgos y proteger a sus familias. Indican que esos conocimientos, además de benéficos para la familia, les brindan opciones para manejar sus cultivos.

Varias de las opiniones expresadas por los agricultores durante el taller de presentación de resultados, están estrechamente relacionadas con los datos obtenidos en el proyecto de investigación de



2005. Los agricultores que manejan plaguicidas reconocen que son prácticas riesgosas: no suelen usar equipo de protección personal para llevar a cabo su trabajo, limpian el equipo que usan para fumigar y se bañan hasta llegar a casa.

Con los resultados expuestos hasta ahora, se esclarece el porqué de la preocupación de los agricultores en relación con su propia salud y la de sus esposas. Para dar continuidad a los estudios y responder a sus inquietudes, en 2010 se realizó un estudio para evaluar la salud reproductiva de las parejas de los agricultores. Los resultados obtenidos por el grupo de trabajo mostraron que la edad de la menarca fue marginalmente menor en las parejas de los agricultores respecto a mujeres cuya pareja no se dedica a la agricultura, el ciclo menstrual no mostró diferencias entre ambos grupos. Ni la frecuencia ni el número de abortos fue diferente entre ambos grupos de mujeres. El número de partos pretérmino fue marginalmente mayor en las parejas de los agricultores (López, 2013).

El taller con las mujeres (T2) estuvo enfocado en conocer qué tan claros les parecieron los temas y materiales presentados con los resultados de los estudios, las formas usuales para lavar la ropa utilizada para fumigar, así como la percepción de riesgo que tienen acerca de la ocupación de sus familiares agricultores. De ahí que los aspectos trabajados fueron: 1) claridad en la presentación de los temas, 2) identificación de qué fue lo más llamativo de la presentación, 3) formas que tienen para lavar ropa impregnada con plaguicidas, 4) protección para lavar la ropa, 5) percepción sobre los efectos en la salud femenina debido al manejo de plaguicidas de sus esposos.

Si bien no todos los resultados de los estudios realizados a las mujeres están concluidos, se optó por comenzar a presentarlos en talleres y continuar las presentaciones cuando estén listos. Esto será parte de la espiral de IAP y el diálogo con los agricultores y sus familiares expuestos a los plaguicidas.

Las mujeres asistentes al taller de devolución de resultados fueron convocadas al evento por medio de visitas a sus hogares. El

taller se realizó por la tarde teniendo en cuenta el horario que las mujeres usan para actividades de esparcimiento, compromisos familiares y tareas escolares de sus hijas e hijos.

La estructura del taller fue 1) presentación de integrantes del equipo de investigación 2) organización de las mujeres en pequeños grupos de trabajo 3) exposición de algunos resultados del estudio con los agricultores y 4) presentación y análisis de resultados del estudio con las mujeres. Por medio de una breve reseña de la devolución de resultados a los agricultores se dio a conocer la principal razón por la que se decidió hacer el estudio con las mujeres, a lo que ellas reaccionaron positivamente agradeciendo al equipo de investigación que tomara en cuenta la opinión de la comunidad. Las mujeres desconocían el sentir de sus parejas respecto a la respuesta emocional de ellas al llegar a sus casas y su reacción por tener el “olor a químico”, así como su preocupación sobre el efecto de los plaguicidas en la salud de las mujeres. En el espacio de reflexión de resultados del estudio con las mujeres, las asistentes se consternaron porque desconocían que la piel tiene poros que son un medio de penetración de los plaguicidas al cuerpo cuando realizan actividades como el lavado de ropa, lo que generó una discusión sobre la *condición ideal* de que la ropa de trabajo no llegue a casa y se lave en el lugar de trabajo. Asimismo expresaron su preocupación por las y los hijos, sobre todo los pequeños, por ser más sensibles, y los cuidados especiales que habría que tener con ellos.

El análisis de contenido de las relatorías del taller reflejó que las participantes apreciaron que se les compartieran los resultados, y tuvieran la oportunidad de reflexionar sobre ellos. Los resultados obtenidos en el taller evidencian la importancia de un acercamiento oportuno con la comunidad para lograr el objetivo de generar conocimiento significativo y que, al retornar la información a la comunidad, se perciban nuevas necesidades y preguntas de investigación.

Involucrar a la población afectada ha sido una meta que varios estudios se han propuesto (Cook, 2008). Resulta fundamental que conozca y analice los resultados de los estudios sobre su salud; que

esté bien informada y sea capaz de nutrir la toma de decisiones individual, grupal y familiar para incidir en ella. En la experiencia Bradbury (2010), los fundamentos de la IAP ayudan porque muestran que la

Orientación hacia la creación de conocimiento surge en el contexto de la práctica y exige a los investigadores trabajar con los profesionales de la acción. A diferencia de la ciencia social convencional, su finalidad no es principal o exclusivamente para comprender los arreglos sociales, sino también para lograr los cambios deseados, como una manera de generar conocimientos y empoderar a los participantes (p. 93).

## CONCLUSIONES

La IAP no es un modelo nuevo, en la metodología cualitativa lleva tiempo empleándose, sin embargo es la vinculación de la IAP con un método cuantitativo, usado en la salud pública, lo que se propuso dar a conocer en este capítulo. Para el logro del objetivo fue fundamental que el grupo de investigación contara con experiencias positivas en el trabajo conjunto de la Ecología Humana y la Toxicología, reflejadas en los facilitadores de la comunidad, y los acompañantes o integrantes del equipo de investigación. Esta vinculación permite una participación más activa de la comunidad para conocer su situación de salud, pero además contribuye a que su interés con respecto a los efectos de los plaguicidas sea más profundo, así como por conocer los cambios que podrían llevar a cabo a nivel individual, familiar, grupal y para generar respuestas a problemas aún no atendidos.

La participación más activa de la comunidad también conlleva ventajas en el proceso de investigación facilitando el muestreo, la recopilación de datos y un mayor control de los criterios de selección muestral. De esta forma también se logra complementar resultados por medio del abordaje cualitativo, la explicación de variables

y adaptaciones metodológicas y logísticas durante la investigación o para futuras investigaciones. Tender puentes de diálogo entre agricultores y sus esposas con las y los investigadores profesionales, propicia una mejor comprensión del por qué son necesarios los estudios realizados y cómo ese conocimiento podría beneficiar a quienes participan.

La interacción de la Toxicología, la Salud Pública y la Ecología Humana con la aplicación de la IAP permitieron responder de una forma más específica cómo ocurre la exposición de los agricultores a los plaguicidas, comprender que en la agricultura están vinculados factores como la dependencia al uso de los químicos para tener una mejor productividad en la cosecha, que los agricultores perciben su uso como un riesgo para su salud y para prevenir este riesgo deben llevar a cabo “buenas prácticas” en su uso y manejo, aunque estas no siempre se apliquen. Otro costo del uso de plaguicidas es el “olor a químico” que se impregna al cuerpo de los agricultores y que conlleva una carga emocional en su relación con la familia.

Por su parte, en la investigación realizada con las parejas de agricultores, la aplicación de este modelo metodológico facilitó la comprensión de las variables de exposición como el lavado de la ropa a mano, encontrar que ellas, puesto que “no se exponen a los químicos si no van al lugar de trabajo ni los respiran, ingieren o tocan directamente”, no identificaban un riesgo a su salud, mientras que después de la difusión y discusión de resultados comprendieron que están expuestas de manera indirecta por el trabajo de sus parejas, lo que las llevó a cuestionarse sobre las prácticas “ideales” de lavado de ropa y almacenamiento de los plaguicidas en casa.

Es de resaltar que, a medida que la espiral avanza en la generación y aplicación de conocimiento, puede evaluarse la información obtenida en proyectos de investigación anteriores, conocer si algunas de las variables han cambiado, si la población se ha apropiado de los conocimientos, y comprender las dificultades que ha tenido en la aplicación de los mismos.

Finalmente, este trabajo: 1) nutre de información a quienes participan a través de la espiral de la IAP para su apropiación y aplicación en la prevención de daños a la salud por la exposición a plaguicidas, se analizan y buscan soluciones beneficiosas y decantan acciones pertinentes, 2) responde a las inquietudes y necesidades de la población por medio de nuevos proyectos, 3) avanza en la formación de recursos humanos e investigación científica en el tema de toxicología de plaguicidas, 4) muestra una aproximación a la percepción del riesgo desde la mirada del género masculino (agricultores) y del femenino (parejas de agricultores) sobre la exposición a plaguicidas y sus riesgos para la salud de las familias agrícolas.

## REFERENCIAS

- Alvarado-Mejía, J., Cobos-Gasca, V. y González-Navarrete, L. (1994). Insecticidas y herbicidas de mayor uso en los horticultores de Yucatán. Implicaciones a la salud y al ambiente. *Rev Biomed*, 5, 180-190.
- Banco Mundial (2012). Área de tierra. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, archivos electrónicos y sitio web. Recuperado en [https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.SRF.TOTL.K2?end=2012&start=2007&year\\_high\\_desc=true](https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.SRF.TOTL.K2?end=2012&start=2007&year_high_desc=true)
- Bradbury, H. (2010). What is good action research? Why the resurgent interest? *Action Research*, 8 (1), 93–109. doi:10.1177/1476750310362435
- Barraza, D., Jansen, K., Van Wendel de Joode, B. & Wesseling, C. (2011). Pesticide use in banana and plantain production and risk perception among local actors in Talamanca, Costa Rica. *Environmental Research*, 111(5), 708-717. doi: 10.1016/j.envres.2011.02.009
- Bernard, R. (1995). *Research Methods in Anthropology. Qualitative and Quantitative Approaches*. Walnut Creek. California, USA: Altamira Press.
- Castillo-Burguete, M. T., Viga de Alva, M. D. & Dickinson F. (2008). Changing the culture of dependency to allow for successful outcomes in participatory research: Fourteen years of experience in Yucatan, Mexico. In P. Reason & H. Bradbury (eds.), *The SAGE Handbook of Action Research*, 522-533. London: SAGE Publications.
- Cook, W. (2008). Integrating research and action: a systematic review of community-based participatory research to address health disparities in environmental

- and occupational health in the USA. *J Epidemiol Community Health*, 62, 668-676. doi: 10.1136/jech.2007.067645
- Delgado, C., Pacheco, J., Cabrera, A., Batllori, E., Orellana, R. & Bautista, F. (2010). Quality of groundwater for irrigation in tropical karst environment: The case of Yucatan, Mexico. *Agricultural Water Management*, 97, 1423-1433. Recuperado en [http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378-3774\(10\)00131-9](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378-3774(10)00131-9)
- Eastmond, A. (1991). Modernización agrícola y modernidad social hacia arriba en el sur de Yucatán. *Revista Nueva Antropología XI*, (039), 189-200.
- Fals-Borda, O. & Rahman, M. A. (1991). *Action and knowledge: Breaking the monopoly with participatory action research*. New York: Apex.
- Grael-Castro, E., Pacheco-Medina, A. y Coronado-Peraza, V. (2009). Origen de los sulfatos en el agua subterránea del sur de la sierrita de Ticul, Yucatán. *Ingeniería Revista Académica*, 13 (1), 49-58. Recuperado en [http://www.revista.ingenieria.uady.mx/volumen13/origen\\_sulfatos.pdf](http://www.revista.ingenieria.uady.mx/volumen13/origen_sulfatos.pdf)
- Greenwood D. J. & Levin, M (1998). *Introduction to Action Research: Social Research for Social Change*. London: Sage publications.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, INEGI (2010). *México en Cifras. Información nacional, por entidad federativa y municipios*. Recuperado el 21 de Agosto de 2012 en <http://www.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=31>
- Kirchhoff, P. (1967). Mesoamérica: Sus límites geográficos, composición étnica y caracteres culturales. En *Revista TLATOANI (Suplemento)*. Recuperado el 22 de agosto de 2016 en [http://portalacademico.cch.unam.mx/materiales/al/cont/hist/mex/mex1/histMexU2OA01/docs/paulKirchhoff\\_mesoamerica.pdf](http://portalacademico.cch.unam.mx/materiales/al/cont/hist/mex/mex1/histMexU2OA01/docs/paulKirchhoff_mesoamerica.pdf)
- López, M. (2013). *Eventos reproductivos adversos en parejas de trabajadores agrícolas de Muna, Yucatán*. (Tesis de Licenciatura). Mérida, México: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Mayan, M. (2001). *An introduction to qualitative methods: a training module for students and professionals*. Edmonton, Canada: Qual Institute Press, International Institute for Qualitative Methodology.
- Metcalfe, C.D., Beddows, P.A., Gold Bouchot, G., Metcalfe, T.L., Hongxia, L. & Van Lavieren, H. (2011). Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Environmental Pollution* 159, 991-997. doi: 10.1016/j.envpol.2010.11.031
- Muñoz-Cervantes, E. G. (2006). Cha'ac, un dios entre la milpa y el riego. *Revista de Geografía Agrícola*, 36, 43-53. <https://chapingo.mx/revistas/revistas/articulos/doc/rga-634.pdf>
- Ortega-Ceseña, J., Espinosa-Torres, F. y López-Carrillo, L. (1994). El Control de Riesgos para la Salud Generados por Plaguicidas Organofosforados en

- México: Retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Salud Pública de México*, 36 (6), 624- 632.
- Padungtod, C., Savitz, D. A., Overstreet, J. W., Christiani, D. C., Ryan, L. M. & Xu, X. (1999). Occupational pesticide exposure and semen quality among Chinese workers. *J. Occup. Environ. Med*, 42, 982–992.
- Pérez-Herrera, N., Polanco-Minaya, H., Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M., Hernández-Ochoa, I., Rojas-García, E., Alvarado-Mejía, J., Borja-Aburto, V. y Quintanilla-Vega, B., (2008). PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230, 261-268. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.02.021>
- Pérez-Herrera, N., May-Pech, C., Hernández-Ochoa, I., Castro-Mañé J., Rojas-García, E., Borja-Aburto V., Castillo-Burguete T. y Quintanilla-Vega, B. (2008a). PON1Q192R polymorphism is associated with lipid profile in Mexican men with Mayan ascendancy. *Experimental and Molecular Pathology*, 85, 129-134. doi:10.1016/j.yexmp.2008.05.003
- Polanco-Rodríguez, A. Batllori-Sampedro, E., Ortega-Canto, J., Mena-Rejón, G., Marrufo-Gómez, J. y Ché-Sunza, O. (2011). *Atlas de riesgo por contaminantes orgánicos persistentes –COPs– (pesticidas) y su relación a cánceres en Yucatán, México*. Mérida, Yucatán: Seduma, Universidad Autónoma de Yucatán, Fondos Conacyt.
- Quintanilla-Vega B, Pérez-Herrera N, & Piña-Guzmán B. (2008). Reproductive toxicity of organophosphorous pesticide is related to alterations in sperm chromatin structure and DNA damage. En B.Albert Tennefy (Ed.), *Pesticide Research Trends* (p. 332-345). USA: Nova Science Publishers, Inc.
- Quintanilla-Vega, B., Pérez-Herrera, N. y Rojas-García, E. (2010). Epidemiological panorama of use and toxicity of organophosphate and carbamate pesticides in Mexico. In T. Satoh y R. G. Gupta (Eds.). *Anticholinesterase pesticides: metabolism, neurotoxicity and epidemiology* (p. 471-480). Mexico: John Wiley and Sons.
- Reason, P. & Bradbury, H. (2001). Preface. En P. Reason & H. Bradbury (eds.). *The Action Research Handbook*, 21-32. London: SAGE.
- Reason, P. & Bradbury, H. (2008). Introduction. En P. Reason & H. Bradbury. *The SAGE Handbook of Action Research: Participative Inquiry and Practice*, (p.1-30). London: SAGE.
- Rodas-Ortiz, J., Ceja-Moreno, V., González-Navarrete, L., Alvarado-Mejía, J., Rodríguez-Hernández, M. & Gold-Bouchot, G. (2008). Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Levels in Human Milk from Chelem, Yucatan, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol*, 80, 255-259. Recuperado en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00128-007-9356-7>



- Romero-Contreras, T. y Avila-Ramos, L. (1999). Mesoamérica: Historia y reconsideración del concepto. *Ciencia Ergo Sum*, 6(3), 233-242.
- Romero M., Rodríguez, E. M., Durand-Smith, A. y Aguilera, R. M. (2003). Veinticinco años de investigación cualitativa en salud mental y adicciones con poblaciones ocultas. Primera parte. *Salud Mental*, 26(6), 76-83. Recuperado en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58262609>
- Sakkas D., Urner F., Bianchi P. G., Bizarro D., Wagner I., Jaquenoud N., Maricardi G. & Campana A. (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Human Reproduction* 837-84311(4), 837-843. Recuperado en <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.610.6913&rep=rep1&type=pdf>
- Sarkar, A., Aronson, K. J., Patil, S., Hugar, L. B. & vanLoon, G. W. (2012). Emerging health risks associated with modern agriculture practices: A comprehensive study in India. *Environmental Research*, 115, 37-50. doi: 10.1016/j.envres.2012.03.005
- Stringer, E. (1996). *Action research: A handbook for practitioners*. CA. USA: Sage.
- Vera-Avilés, M., Castillo-Burguete, M., Alvarado-Mejía, J., Quintanilla-Vega, B., González-Navarrete, L., Palma-Solís, González-Herrera, L., Pérez-Herrera, N. (2011). No sé si estoy enferma, si lo llegara a saber creo que me encapricharía. Exposición a plaguicidas en Mujeres. *I Coloquio Regional de la Red de Estudios de Género de la Región Sur-Sureste de la ANUIES*. Mérida, Yucatán 16 y 17 de Noviembre de 2011.
- World Bank, (2012). Food and Agriculture Organization electronic files and web site. Recuperado el 22 de noviembre de 2012 de <http://data.worldbank.org/indicator/AG.SRF.TOTL.K2>
- World Health Organization, WHO (2002). *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Yongbo, L., Fengqiao, L. Xubin, P &, Junsheng, L. (2012). Protecting the Environment and Public Health from Pesticides. *Environmental Science & Technology*, 46, 5658-5659. doi: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es301652v>

---

## CAPÍTULO 5

### **ESTRATEGIAS PARA DETECTAR ALTERACIONES DEL CICLO MENSTRUAL EN ADOLESCENTES DE UNA COMUNIDAD AGRÍCOLA DE SAN LUIS POTOSÍ**

*Leticia Yáñez Estrada, Andrea Rodríguez López,  
Rebeca Mejía Saucedo y Jaqueline Calderón Hernández*

#### **INTRODUCCIÓN**

Las problemáticas que inciden en la salud sexual y reproductiva de las mujeres debido a impactos ambientales causados por agentes químicos son relevantes no solo en términos de los procesos de salud-enfermedad y sus aspectos biomédicos, sino también por la influencia que estos elementos tienen en la vida de las mujeres. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la salud reproductiva como:

Un estado general de bienestar físico, mental, social, y no de mera ausencia de enfermedades y dolencias, en todos los aspectos relacionados con el sistema reproductivo y sus funciones y procesos. En consecuencia la salud reproductiva entraña la capacidad de disfrutar de una vida sexual satisfactoria y sin riesgos y de procrear, y la libertad para decidir hacerlo o no hacerlo, cuándo y con qué frecuencia (...) el derecho a recibir servicios adecuados de atención de

la salud que permitan los embarazos y los partos sin riesgos, y den a las parejas las máximas posibilidades de tener hijos sanos (Organización Mundial de la Salud, 2003, p. 4).

El derecho a gozar de una vida sexual y reproductiva plena y sin riesgos se vulnera cuando las personas que están expuestas a ciertos agentes químicos no reciben información de los daños que pueden ocasionarles. Este texto pretende contribuir a la generación de conocimientos al respecto desde un enfoque biomédico, sin desestimar otras aproximaciones que pueden nutrir la discusión, tomando en cuenta que la sexualidad (en la que está inmersa la salud reproductiva) implica factores sociales y culturales, entre los que se encuentra la construcción sociocultural de la diferencia sexual, es decir, el género. Esto, sin duda afecta e influye en los procesos de salud-enfermedad a que se ven sometidas las mujeres.

## EL PROBLEMA

Una limitante en el abordaje para evaluar las alteraciones en el ciclo menstrual (CM), es la falta de confiabilidad en el levantamiento de la información ya que, en la mayoría de los casos, es recabada mediante entrevistas y/o cuestionarios, en los que solo es posible registrar el comportamiento del CM de unos cuantos meses, debido a que los datos están sustentados en la memoria de las participantes (Montoya, Hernández, Mendoza, Cárdenas y Villasis, 2012; Sánchez, Fuentes y Díaz, 2005; Escobar *et al.*, 2010). El diseño de una serie de estrategias como pláticas de concientización para incentivar el apego al uso de un diario-bitácora, elaborado ex-profeso para la población de estudio (adolescentes no ocupacionalmente expuestas a una mezcla de plaguicidas), dio la pauta para registrar, de la manera más objetiva posible, las características de su CM durante 15 meses consecutivos. Esta información, junto con los valores de los niveles séricos de las hormonas

sexuales y de 12 plaguicidas organoclorados y urinarios de los metabolitos más representativos de los plaguicidas organofosforados, permitieron detectar las alteraciones del CM y del perfil hormonal, ocasionadas por la exposición a estos contaminantes (Rodríguez, 2015).

## ANTECEDENTES

De acuerdo con la OMS, la adolescencia comprende el periodo de edad entre los 9 y 19 años de vida. Diversos factores pueden influir en la cronología de esta etapa como: las condiciones socioeconómicas, el estado nutricional, de bienestar general y sanitario, y otros genéticos (Braunwald y Harrison, 2002).

En el caso de las adolescentes, el proceso de maduración sexual se desarrolla por la activación del eje hipotálamo–hipófisis que estimula las glándulas gonadales y activa la producción de hormonas sexuales. Por otro lado, el eje hipotalámico–hipofisario–gonadal es controlado por la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la cual es liberada de manera pulsátil, lo que genera la secreción de la hormona hipofisaria Luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH). A lo largo de la maduración del eje reproductor, se gestará el patrón de retroalimentación que, junto con estas hormonas, el estrógeno y la progesterona, darán lugar al perfil hormonal que caracteriza al ciclo menstrual. La edad promedio de la menarquia (primer sangrado menstrual) en el ámbito internacional es de 12.8 años de edad (Braunwald y Harrison, 2002).

La secreción de estradiol del ovario genera el desarrollo mamario y el crecimiento del vello púbico y axilar. Paralelo a estos cambios, el útero también sufre alteraciones de tamaño y forma. El incremento de los niveles androgénicos suprarrenales y ováricos aumenta la libido, y este factor biológico incide en la búsqueda del inicio de vida sexual coital, aunque existen otros elementos sociales y culturales que influyen en dicha decisión. La edad promedio en

la que las adolescentes comienzan con una vida sexual activa oscila entre los 15 y 18 años de edad (Braunwald y Harrison, 2002).

Aunado a los cambios hormonales, las jóvenes experimentan cambios físicos (desarrollo de las características sexuales secundarias), psicológicos y sociales, tales como la evolución del pensamiento abstracto, la independencia respecto a la familia y la formación de la personalidad y de la identidad sexual. Asimismo, durante esta etapa pueden existir eventos adversos como la pubertad precoz (inicio de esta fase antes de los nueve años de edad), telarquia prematura (crecimiento mamario en ausencia de otro signo de pubertad) o pubertad retrasada (ausencia de los primeros síntomas de pubertad a los 14 años) (Braunwald y Harrison, 2002).

### **CICLO MENSTRUAL (CM)**

Desde la menarquia hasta la menopausia el ovario libera mensualmente un óvulo fecundable, por lo que existe un proceso cíclico en las trompas de Falopio, la vagina y el útero en función de los cambios hormonales producidos por el ovario (Tresguerres, 2016).

El ciclo menstrual está conformado por las siguientes fases:

- a) Fase folicular temprana (del día 1 al 4). Es el inicio del periodo menstrual (sangrado), en el que comienza el desarrollo progresivo de los folículos primarios, debido al incremento de los niveles de FSH; el resto de las hormonas sexuales se encuentran en sus niveles basales.
- b) Fase folicular media (del día 5 al 7). Aumentan las concentraciones de estrógenos e inhibina y disminuyen los niveles de FSH, lo que conduce a que solo un folículo se convierta en dominante.
- c) Fase folicular tardía (del día 8 al 12). Hay un aumento de las concentraciones estrogénicas, especialmente de LH, produciendo el pico ovulatorio de estas hormonas. Se presenta un engrosamiento en las paredes del endometrio y el moco

cervical se cristaliniza, debido al alto contenido de cloruro sódico, por la acción estrogénica.

- d) Fase ovulatoria (del día 13 al 15). Se alcanza el pico máximo de concentración de estradiol, LH y FSH. En esta etapa, el folículo maduro libera al óvulo y se transporta a través de las trompas de Falopio. El endometrio alcanza la máxima proliferación y el moco cervical se presenta con mayor cristalinización y fluidez.
- e) Fase lútea inicial (del día 16 al 21). Después de liberado el óvulo, el folículo sufre alteraciones morfológicas, convirtiéndolo en una estructura amarillenta, llamado cuerpo lúteo que causará un aumento en la concentración de progesterona, mientras que, debido a la retroalimentación negativa, los niveles de LH y FSH disminuyen al final de esta fase hasta sus niveles basales. El endometrio alcanza la madurez para un proceso de fecundación.
- f) Fase luteínica media (del día 22 al 24). La progesterona alcanza su pico máximo de concentración, la secreción del moco cervical disminuye y se vuelve espeso, lo cual dificultará el paso de los espermatozoides.
- g) Fase luteolítica (del día 25 al 28). Los niveles esteroideos disminuyen hasta sus concentraciones basales, mientras que se incrementa la concentración de la hormona gonadotropina FSH, este aumento dará inicio al periodo menstrual (Tresguerres, 2016).

### **Factores que alteran el comportamiento del Ciclo Menstrual (CM)**

Tanto el ciclo, como el periodo menstrual pueden ser afectados por tres factores principales: a) Clínicos, como los tumores en los ovarios. b) Estilos de vida, como ocurre con el estrés que ocasiona una disminución de los pulsos de la hormona gonadotropina

causando periodos de amenorrea y c) Ambientales, derivados de la exposición a compuestos tóxicos que pudiesen comportarse como hormonas al mimetizar o potenciar la acción de estas, causando ciclos irregulares o dificultades para embarazarse (Braunwald y Harrison, 2002; Schiavon-Ermani y Jiménez-Villanueva, 2001; Valls-Llobet, 2011).

Al respecto, los agroquímicos han sido catalogados como perturbadores endocrinos por su capacidad de alterar el equilibrio hormonal, ya sea suprimiendo, aumentando o disminuyendo la acción de las hormonas.

### **Estudios que relacionan alteraciones del Ciclo Menstrual (CM) con la exposición a plaguicidas**

Los reportes en la literatura, cuyo objetivo ha sido evaluar si existe una asociación entre la exposición a plaguicidas y las alteraciones en el CM, se han hecho con base en la aplicación de cuestionarios y/o entrevistas, por lo que los resultados dependen de lo que recuerden las participantes.

Axmon, Rylander, Strömberg y Hagmar (2004) realizaron un estudio en Suecia (en el área del Báltico y en la zona Oeste), en el que participaron 3 082 mujeres, de entre 25 y 55 años de edad, quienes fueron divididas en dos grupos: el primero, conformado por las hermanas de los pescadores de dicha zona, y el segundo, por las esposas de estos. El comportamiento de su CM se dedujo de las respuestas al cuestionario que se les envió por mensajería, en el que se les preguntaron datos como: duración de su periodo, uso de anticonceptivos y tiempo que tardaron para lograr el embarazo. Para evaluar la exposición a plaguicidas organoclorados, se les preguntó la frecuencia de consumo de pescado y su lugar de residencia, entre otros datos. Con base en esa información, los resultados reportaron que aquellas mujeres que consumían pescado de la zona del Báltico, presentaban periodos menstruales más cortos que las mujeres que



vivían en otras zonas. No encontraron diferencias significativas en la duración de los ciclos menstruales, la cual fue de 27 a 30 días.

Chen *et al.* (2005) realizaron un estudio con mujeres de Shangai, China para evaluar la asociación entre las concentraciones séricas de DDT (insecticida organoclorado ampliamente empleado para el control de paludismo) y la duración de sus ciclos menstruales. La población de estudio se dividió en tres grupos de acuerdo a la zona geográfica (rural, suburbana y urbana), cada grupo estuvo integrado por 20 mujeres. Sus edades fluctuaron de los 20 a los 24 años y la estrategia para evaluar el comportamiento del ciclo menstrual se basó en un cuestionario aplicado por personal de los centros de salud de cada zona. Para ello, se pidió a las mujeres que recordaran cómo había sido su CM (regular o irregular) durante los últimos 12 meses, el número de toallas usadas por periodo (abundancia de menstruación), duración del periodo (días de sangrado), uso de anticonceptivos y sangrados intermenstruales.

Al comparar los resultados entre las diferentes zonas se observó que las mujeres de las regiones rurales usaban mayor número de toallas sanitarias en cada periodo (aproximadamente 18 por mes), presentaban más ciclos irregulares y más casos de sangrados intermenstruales.

Las mujeres con concentraciones séricas altas de DDT ( $>32.5$   $\mu\text{g/L}$ ), presentaron ciclos menstruales largos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Chen *et al.*, 2005).

Toft, Axmon, Lindh, Giwercmany y Bonde (2007) realizaron un estudio con el fin de evaluar el comportamiento del ciclo menstrual de mujeres europeas (polacas, suecas y ucranianas) y de mujeres indígenas inuit de Groenlandia expuestas a compuestos organoclorados. Participaron 1 494 mujeres mayores de 18 años de edad y la población se estratificó de acuerdo a su procedencia. Para evaluar la exposición a plaguicidas organoclorados y PCBs se colectó una muestra de sangre para cuantificar sus niveles séricos. El CM se evaluó a través de una entrevista, en la cual se les solicitó que recordaran la duración de sus dos últimos ciclos; tenían que

elegir la mejor respuesta entre cuatro opciones: a) número de días exactos (ejemplo: 28 días), b) entre cierto número de días (ejemplo: de 25 a 27), c) no hubo menstruación y d) no lo recuerda. A pesar de no resultar ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los cuatro grupos, se encontró que las mujeres inuit con las concentraciones séricas más altas de DDE (metabolito principal del DDT) y PCBs (>150 ng/ g lip), presentaron mayor porcentaje de ciclos largos e irregulares, y las mujeres suecas con altas concentraciones del PCB-153 (50 a 150 ng/g lip) reportaron mayor porcentaje de ciclos cortos.

Buck Louis *et al.* (2011) realizaron un estudio para evaluar la asociación entre las características del ciclo menstrual de 83 mujeres canadienses de 18 a 45 años de edad y la exposición a plaguicidas organoclorados y PCBs. Colectaron una muestra de sangre para cuantificar los niveles séricos de 12 plaguicidas organoclorados y 76 congéneres de PCBs. La evaluación del ciclo menstrual se realizó mediante una entrevista, además se entregó un diario a las participantes para que registraran las características de sus CM durante 12 meses. Cabe mencionar la gran dificultad que implicó convencer a las integrantes del grupo de estudio para que escribieran de manera disciplinada todos los eventos de su CM a lo largo del estudio, amén de que el uso del diario en población abierta es muy complicado. El registro de la información fue llevado a cabo por 79% de las participantes durante un periodo que varió entre uno y cinco meses, mientras que solo 21% lo hizo durante siete meses. No obstante el bajo nivel de respuesta y la falta de información, fue posible asociar la duración corta del CM con la exposición a los plaguicidas, mientras que la exposición a PCBs se asoció con los ciclos largos.

Luderer *et al.* (2013) realizaron un estudio en Oahu (Isla de Hawái), EUA, cuyo objetivo fue evaluar el comportamiento del CM de mujeres que estuvieron expuestas durante su gestación y lactancia a Heptacloro epóxido (plaguicida OC), debido a que sus madres consumieron durante estos periodos leche contaminada con este

insecticida. Participaron 1 836 mujeres de entre 29 y 34 años de edad, a las cuales se les proporcionó un diario para que durante dos meses registraran eventos relacionados con su CM, tales como: duración del ciclo y del periodo, dolor o malestar durante el mismo y uso de medicamentos. El resultado obtenido fue que 67% de las participantes reportaron ciclos regulares, 14% periodos de amenorrea y 19 % declararon haber tenido ciclos irregulares.

Debido a que ninguna de las mujeres participantes recabó toda la información solicitada a lo largo de los dos meses del estudio, se seleccionó de cada una, el mes con el registro de información más completo para realizar la evaluación de la exposición al Heptacloro epóxido y su impacto sobre el CM. Se concluyó que no hubo una asociación estadísticamente significativa.

El único informe elaborado sobre la población mexicana es el reportado por Levario-Carrillo *et al.* (2004), quienes observaron en un estudio de casos y controles con mujeres adultas del estado de Chihuahua, una relación entre la exposición a una mezcla de plaguicidas organofosforados y el retraso en el crecimiento intrauterino.

### **Estrategias para detectar alteraciones del CM**

Como puede apreciarse, 95% de los estudios citados evalúan, tanto la exposición a plaguicidas como el comportamiento del CM, con base en entrevistas y/o cuestionarios pese a todas las dificultades y limitaciones ya descritas.

Así pues, el grupo de investigación que realizó el presente estudio, diseñó una serie de estrategias para evaluar de manera objetiva el efecto de la exposición a los agroquímicos sobre el comportamiento del CM de un grupo de 32 adolescentes de 12 a 15 años de edad, residentes de una comunidad cuya principal actividad es la agricultura. Cabe mencionar que 16 de ellas ya habían participado en un estudio previo para evaluar posible daño neurológico por la exposición a estos contaminantes (Rodríguez, 2015).

**Primera estrategia.** Consistió en desarrollar herramientas para aumentar el apego al uso del diario-bitácora (calendario mensual), para lo cual, se organizó una serie de pláticas de concientización relacionadas con la salud femenina, la descripción de las características del ciclo menstrual, distinción entre ciclo y periodo, definición de un ciclo y un periodo corto, definición de un ciclo y un periodo largo, consecuencias de cada uno de ellos, descripción del perfil hormonal, sus variaciones a lo largo del CM y las consecuencias de su desequilibrio, así como los tipos de anticonceptivos, sus ventajas y desventajas, entre otros temas (figura 1).

**Figura 1**



Primera plática con las adolescentes y sus mamás.

**Segunda estrategia.** Se diseñó y aplicó un cuestionario para recabar información relacionada con su salud ginecológica, su participación en actividades agrícolas, así como sus usos y costumbres. Para ello, tanto las participantes como sus madres, fueron citadas en el centro de salud de la comunidad. El cuestionario fue resuelto en formato de entrevista individual (figura 2).

**Figura 2**



Entrevista individual a una de las participantes para responder las preguntas del cuestionario sobre salud ginecológica, usos y costumbres y actividades agrícolas.

**Tercera estrategia.** Una vez que se logró la confianza, tanto de las participantes como de sus madres, se les instruyó para que durante 15 meses registraran en el diario-bitácora todos los eventos relacionados con su ciclo y periodo menstrual. Las participantes marcaron con un asterisco el inicio y el término del periodo; con una X la abundancia del periodo (XXX sangrado abundante = más de 4 toallas sanitarias usadas, XX sangrado normal = 3 toallas empleadas y X sangrado escaso = un solo cambio); y con caritas de tristeza o felicidad según correspondiera, la presencia de síntomas premensuales y/o molestias durante el periodo menstrual. Asimismo se les hizo hincapié en la importancia de los periodos de amenorrea, por lo que también fueron registrados (figura 3).

Figura 3



Ejemplo del registro de los diferentes eventos de un mes en el diario-bitácora de una de las participantes.

Para verificar el registro correcto de la información en el diario-bitácora, se realizaron visitas mensuales programadas a la comunidad; las adolescentes eran citadas en el centro de salud (figura 4). Además se realizaron cuatro visitas sorpresa a sus domicilios. Cabe señalar que la mayoría de las jóvenes adoptaron el diario-bitácora como suyo, registrando no solo los eventos relacionados con su CM, sino también actividades escolares, de amigos y familiares. Por petición de las madres, se diseñó una versión de bolsillo para ellas.

Figura 4



Reunión con las adolescentes participantes en el centro de salud de la comunidad.

**Cuarta estrategia.** Quince meses después de haber comenzado a usar el diario-bitácora, se colectó una muestra de sangre de las adolescentes en ayunas para cuantificar los niveles séricos de las hormonas sexuales: LH, FSH, progesterona, estradiol y prolactina, empleando un ensayo quimioluminiscente, para evaluar su perfil hormonal.

Para estudiar el comportamiento del CM, la población se estratificó de acuerdo a la duración de sus ciclos y periodos; se consideró como ciclos cortos aquellos menores a 24 días, normales los de 24 a 32 días y largos los mayores a 32 días. Con respecto a la duración de los periodos, se consideraron cortos los menores de 4 días, normales los de 4 a 7 días y periodos largos los mayores de 7 días.

El resultado obtenido indicó que 42.4% de las adolescentes presentó ciclos normales, en tanto que 42.4% tuvo ciclos largos y el restante 15.2% manifestó ciclos cortos. Con respecto a la duración de los periodos, 62.2% presentó periodos normales, 20.6% periodos largos y 17.2% periodos cortos.

**Quinta estrategia.** Se realizó una evaluación cuantitativa de la exposición a los agroquímicos, para ello se colectó una muestra de sangre para cuantificar los niveles séricos de 12 plaguicidas organoclorados (a-BHC, b-BHC, g-BHC, HCB, Aldrin, Heptacloro epóxido, Trans-nonaclor, Cis-nonaclor, 2-4'DDE, 4,4'DDE, 2-4'DDT Y 4-4'DDT); para evaluar la exposición a plaguicidas organofosforados se recolectó la primera orina de la mañana durante siete días consecutivos y a partir de estas, se generó una muestra compuesta para cuantificar los seis metabolitos dialquilfosfatos más importantes (DAPs: DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP).

Para la cuantificación de ambos grupos de plaguicidas se empleó Cromatografía de Gases-Masas (CG-EM).

El procedimiento mostró que 96.8% de las adolescentes presentaron niveles detectables en plasma de g-BHC y urinarias de DEDTP, mientras que en 93.5%, 87.5% y 84.2% de las participantes se detectaron DMTP, 4-4 DDE y Cis-nonaclor respectivamente.



Puesto que la distribución de los datos no fue normal, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para evaluar la relación entre las concentraciones plasmáticas de los plaguicidas OCs, urinarias de los metabolitos DAPs (expresadas como mediana), las características del periodo y ciclo menstrual y los niveles séricos de las hormonas (LH, FSH, progesterona, estradiol y prolactina).

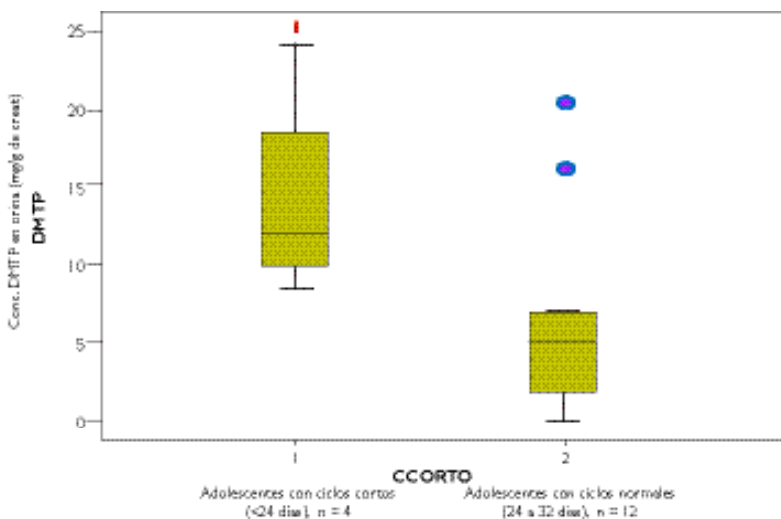
Con respecto al efecto de la exposición a la mezcla de plaguicidas organoclorados sobre la duración del periodo, se observó que aquellas adolescentes que reportaron periodos cortos (< 4 días), presentaron concentraciones plasmáticas superiores de g-BHC y de 2-4 DDE en comparación con las participantes que registraron periodos normales, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En relación con la duración de los ciclos menstruales, aquellas adolescentes que reportaron ciclos cortos (< 24 días), presentaron niveles séricos superiores de a-BHC, Cis-nonaclor, 2-4 DDE, 4-4 DDE y 2-4 DDT en relación con las que registraron ciclos normales.

En cuanto a la exposición a plaguicidas organofosforados, se observó que aquellas adolescentes que presentaron ciclos cortos (< 24 días), tuvieron concentraciones hasta tres veces mayores del metabolito dimetiltiofosfato (DMTP), a diferencia de las participantes que reportaron ciclos normales (24 a 32 días) (12.08 vs 4.98 mg DMTP/ g creat,  $p = 0.002$ ), figura 5.

Con respecto al efecto de la exposición a estos agroquímicos y el perfil hormonal de los 12 plaguicidas OCs que se monitorearon, solo el 2-4 DDE, Aldrin, g-BHC y Heptacloro époxido mostraron una asociación con los niveles hormonales de progesterona, FSH y estradiol.

Figura 5

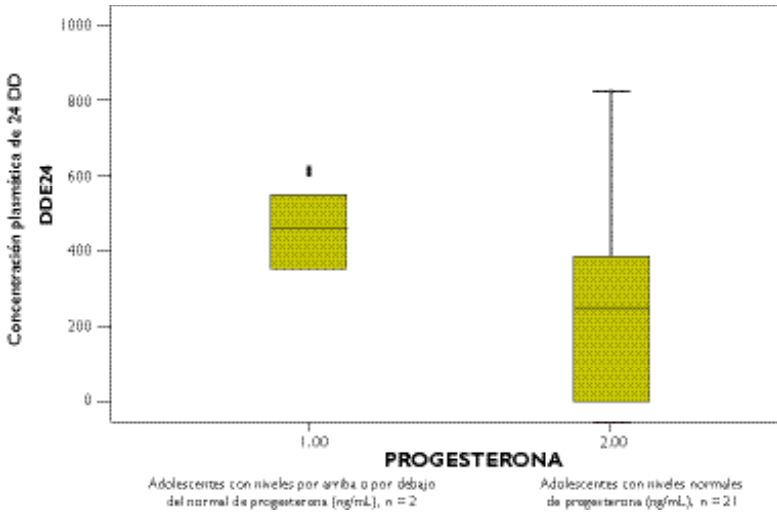


Comparación entre la concentración urinaria de dimetiltiofosfato (DMTP), expresada como mediana e intervalo de confianza al 95% y la duración del ciclo menstrual. \* $p = 0.02$ . Ciclo corto < 24 días, Ciclo normal = 24 a 32 días. ● = participantes con ciclos normales, pero con concentraciones de DMTP tres veces por arriba de la mediana.

En la figura 6 se comparan las concentraciones plasmáticas del 2-4 DDE con los niveles séricos de progesterona, se observa que en aquellas adolescentes con niveles normales de esta hormona, la concentración plasmática del 2-4 DDE fue significativamente menor ( $p = 0.05$ ) que la detectada en las participantes con valores por arriba o por debajo del valor normal de esta (250.45 vs 449.26 ng 2-4 DDE/gr lip).

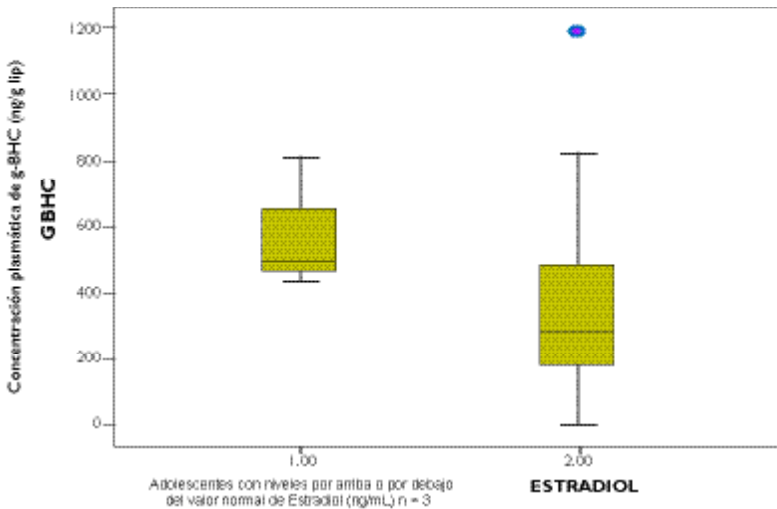
Las participantes con niveles normales de estradiol, presentaron concentraciones de g-BHC significativamente menores que las detectadas en las adolescentes con valores por arriba o por debajo del valor normal de esta hormona (281.6 vs 494.10 ng g-BHC/ g lip,  $p = 0.05$ ) (figura 7).

Figura 6



Comparación entre la concentración plasmática del 2-4 DDE, expresada como mediana e intervalo de confianza al 95% y los niveles séricos de progesterona. \*p = 0.05.

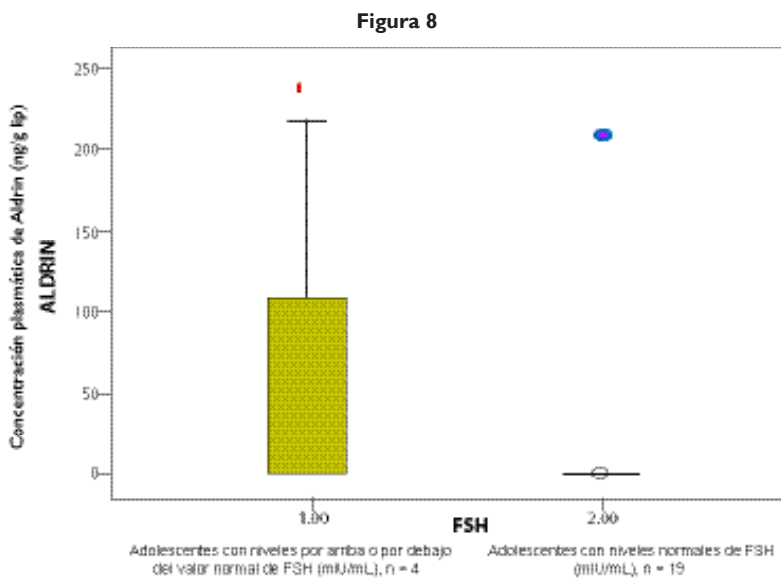
Figura 7



Comparación entre la concentración plasmática de g-BHC, expresada como mediana e intervalo de confianza al 95% y los niveles séricos de Estradiol. \*p = 0.05, ● = participante con valor normal de Estradiol, pero con concentraciones plasmáticas de g-BHC tres veces por arriba de la mediana.

En la figura 8 se muestra el resultado de cuatro participantes que presentaron niveles séricos de FSH por arriba o por debajo del valor normal y cuya concentración plasmática de Aldrin fue significativamente superior, con respecto a las adolescentes cuyos niveles de esta hormona estuvieron dentro del intervalo normal y sus concentraciones del insecticida fueron menores (0.57 vs 0.28 ng Aldrin / gr lip,  $p = 0.01$ ).

En cuanto a las concentraciones plasmáticas detectadas del plaguicida Heptacloro epóxido y los niveles séricos de progesterona, se observó que aquellas adolescentes que presentaron una alteración en los niveles de esta hormona, su concentración plasmática de este plaguicida fue estadísticamente superior, al compararla con aquellas cuyos valores de la hormona fueron normales (155.96 vs 0.347 ng Heptacloro epóxido/g lip,  $p = 0.05$ ).

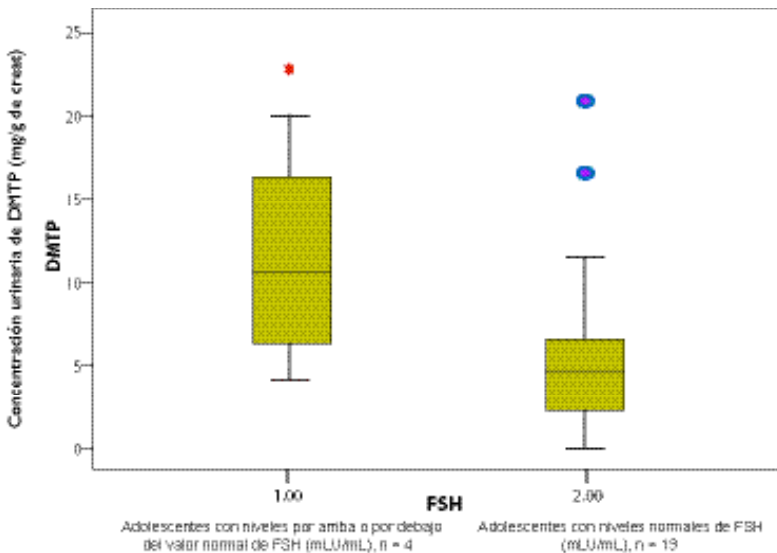


Comparación entre la concentración plasmática de Aldrin, expresada como mediana e intervalo de confianza al 95% y los niveles séricos de FSH. \* $p = 0.01$ , ● = participante con valor normal de FSH, pero con concentraciones plasmáticas de Aldrin tres veces por arriba de la mediana.

En 28% de las adolescentes se detectó una tendencia negativa estadísticamente no significativa, entre las concentraciones elevadas de a-BHC, b-BHC, Heptacloro epóxido, y Cis- nonaclor y los niveles séricos de las hormonas sexuales: FSH, LH y estradiol.

En lo que respecta al efecto de la exposición a plaguicidas organofosforados sobre el perfil hormonal, el metabolito dimetilfosfato (DMTP) presentó una asociación con los niveles de FSH. En la figura 9, se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las adolescentes que presentaron alteraciones en los niveles séricos de FSH y las que mostraron valores normales. La concentración urinaria promedio de DMTP del primer grupo fue estadísticamente superior a la de las adolescentes cuyos valores de esta hormona fueron normales (10.48 mg vs 4.73 mg DMTP /g creat,  $p = 0.05$ ).

Figura 9



Comparación entre la concentración urinaria de dimetilfosfato (DMTP), expresada como mediana e intervalo de confianza al 95% y los niveles séricos de FSH. \* $p = 0.05$ , ● = participantes con valor normal de FSH, pero con concentraciones de DMTP tres veces por arriba de la mediana.

En cuanto al DMP, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las adolescentes que presentaron niveles superiores de este metabolito y alteraciones de LH, con respecto a las jóvenes que no presentaron variaciones de esta hormona (7.24 vs 0.01 mg DMP/g creat,  $p = 0.03$ ). Cabe resaltar que una adolescente presentó niveles normales de LH, no obstante que su concentración urinaria de DMP fue extraordinariamente superior (69.17 mg DMP/g creat).

Con relación a este mismo metabolito, aquellas adolescentes con concentraciones altas de DMP (media de 31.8 mg DMP/gr creat) reportaron niveles séricos altos de prolactina, estradiol y progesterona, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo.

Participantes con concentraciones urinarias altas de DEDTP (media de 1.9 mg DEDTP/gr creat), registraron alteraciones no estadísticamente significativas de los niveles séricos de FSH, LH y progesterona.

## CONCLUSIONES

Con la implementación de las cinco estrategias, se logró el apego al uso del diario-bitácora, por lo que no hubo pérdida de información de los diferentes eventos relacionados con el periodo y el ciclo menstrual de cada una de las participantes. Las alteraciones registradas del perfil hormonal son confiables, ya que se sabía con precisión en qué día del CM se encontraba cada una de las adolescentes en el momento en el que se colectó la muestra de sangre para la cuantificación sérica de las diferentes hormonas sexuales.

Las determinaciones por CG-EM de los niveles séricos de los plaguicidas organoclorados y urinarios de los metabolitos de plaguicidas organofosforados permitieron evaluar de manera objetiva la magnitud de la exposición a estos agroquímicos. Reportes en la literatura indican que bajo estos escenarios, se podría crear un patrón de alteraciones en las generaciones subsecuentes que afectaría no solo a estas adolescentes, sino también a sus hijas, por lo que las

jóvenes serían propensas a desarrollar cáncer de mama, a presentar abortos e infertilidad y sus hijas pudiesen tener bajo peso al nacer, pubertad precoz y susceptibilidad a diferentes tipos de cáncer entre otras afectaciones (ISTAS, 2010; Andrade-Ribeiro, Pacheco-Ferreira, Nóbrega da Cunha y Mendes-Kling, 2006; Fowler *et al.*, 2012; Bergman, Heindel, Jobling, Kidd y Zoeller, 2013).

No obstante que se demostró estadísticamente que las alteraciones observadas en el comportamiento del ciclo y del periodo menstrual, así como en los niveles de las hormonas sexuales, se relacionan con la magnitud de la exposición a los agroquímicos evaluados, se propone incluir otros componentes que también pudiesen tener una injerencia en estas alteraciones, tales como: estrés, mediante la cuantificación de los valores séricos de cortisol y la aplicación de la prueba psicosocial Cuestionario de Sucesos de Vida, con la cual también se puede evaluar ansiedad y depresión; trastornos de la alimentación, mediante la prueba psicosocial EDI y el registro de medidas antropométricas; así como alcoholismo y farmacodependencia, con el empleo de las pruebas psicosociales AUDIT. Con toda esta información generada, se tendría un panorama más completo de aquellos factores que tienen una participación importante en la regulación del CM, además, se podría diseñar e implementar un programa piloto de intervención selectiva, basado en el principio precautorio, con la finalidad de detectar de manera temprana problemas de salud ginecológica en las adolescentes de esta comunidad, cuyo beneficio también se vería reflejado en las generaciones subsecuentes.

Como se señaló al inicio de este capítulo, la investigación se realizó con un enfoque biomédico, por lo que se antoja efectuar otros estudios con perspectivas sociológicas y antropológicas en las que se incorpore como otra de las variables al género, ya que la salud de las mujeres está condicionada no solo por su particular anatomía y fisiología, sino por los condicionamientos de género que las llevan a permanecer en sus casas, o bien, a ocupar ciertos trabajos, los peor pagados o en malas condiciones, a diferencia de los que realizan los



varones. En el caso particular de las zonas agrícolas, las mujeres están expuestas a los plaguicidas en dos escenarios típicos, aun sin participar en las tareas del campo, el primero es durante el lavado de la ropa de trabajo de los varones de la familia, ya que durante el tallado de la misma, los residuos de los agroquímicos que están adheridos a la tela, son liberados al ambiente y como consecuencia, ellas los inhalan; el segundo escenario es cuando las hijas llevan la comida a las parcelas, independientemente si están o no rociando los plaguicidas, ellas “entran” a dejar los alimentos sin protección alguna, por lo que se exponen a los mismos de manera importante.

## REFERENCIAS

- Andrade-Ribeiro, A. L. F. A., Pacheco-Ferreira, A., Nóbrega da Cunha, C. L., Mendes-Kling, A. S. (2006). *Disruptores Endocrinos: potencial problema para la salud y medio ambiente*. *Biomed*, 17, 146-150. Recuperado en <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio062i.pdf>
- Axmon, A., Rylander, L., Strömberg, U. & Hagmar, L. (2004). Altered menstrual cycles in women with a high dietary intake of persistent organochlorine compounds. *Chemosphere*, 56(8), 813-819. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.03.002
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd K. A. & Zoeller R. T. (eds.) (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012*. Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC). United Nations Environment Programme and the World Health Organization.
- Braunwald, E. y Harrison, T. (2002). *Harrison. Medicina Interna* (15ava Ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.
- Buck Louis, G. M., Rios, L. I., McLain, A., Cooney, M. A., Kostyniak, P. J. & Sundaram, R. (2011). Persistent organochlorine pollutants and menstrual cycle characteristics. *Chemosphere*, 85(11), 1742-1748. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.09.027
- Chen, A., Zhang, J., Zhou, L., Gao, E., Chen, L., Rogan, W. y Wolff, M. (2005). DDT serum concentration and menstruation among young Chinese women. *Environmental Research*, 99(3), 397-402. doi: 10.1016/j.envres.2004.12.015
- Escobar, M. E., Pipman, V., Arcari, A., Boulgourdjian, E., Keselman, A., Pasqualini, T., Alonso, G. y Blanco, M. (2010). Trastornos del ciclo menstrual en la adolescencia. *Arch Argent Pediatr*, 108 (4), 363-369. Recuperado en <http://>

[www.sap.org.ar/uploads/consensos/trastornos-del-ciclo-menstrual-en-la-adolescencia.pdf](http://www.sap.org.ar/uploads/consensos/trastornos-del-ciclo-menstrual-en-la-adolescencia.pdf)

- Fowler, P. A., Bellingham, M., Sinclair, K. D., Evans, N. P., Pocar P., Fischer, B., O'Shaughnessy, P.J. (2012). Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355(2), 231–239 doi: 10.1016/j.mce.2011.10.021
- Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud (ISTAS), (2010). *Disruptores Endocrinos: Un nuevo riesgo tóxico*. Recuperado en <http://tusaludnoestaennomina.com/wp-content/uploads/2014/12/Disruptores-endocrinos-un-nuevo-riesgo-t%C3%B3xico.pdf>
- Koepfen, B. y Stanton, B. (2009). *Berne y Levy. Fisiología +Student Consult*. Barcelona, España: Elsevier España.
- Lalonde M. (1981). A new perspective on the health of Canadians. A working document, Government of Canada, Minister of Supply and Services Canada.
- Levario-Carrillo, M., Amato, D., Ostrosky-Wegman, P., González-Horta, C., Corona, Y. & Sanin, L. (2004). Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere*, 55(10), 1421-1427. doi: 10.1016/j.chemosphere.2003.11.027
- Luderer, U., Kesner, J. S., Fuller, J. M., Krieg Jr., E. F., Meadows, J. W., Tramma, S. L., Ynag, H. & Baker D. (2013). Effects of gestational and lactational exposure to heptachlor epoxide on age at puberty and reproductive function in men and women. *Environmental Research*, 121, 84-94. doi:10.1016/j.envres.2012.11.001
- Montoya, J., Hernández, A., Mendoza, O., Cárdenas, R. y Villasis, M. A. (2012) Alteraciones menstruales en adolescentes. *Revista del Hospital Médico Infantil de México*, 69(1), 63-76. Recuperado en <http://www.medigraphic.com/pdfs/bmhim/hi-2012/hi121j.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2003). Salud reproductiva. Proyecto de estrategia para acelerar el avance hacia el logro de los objetivos y metas internacionales de desarrollo. OMS. Recuperado el 11 de septiembre de 2016 de [http://apps.who.int/gb/archive/pdf\\_files/EB113/seb11315a1.pdf](http://apps.who.int/gb/archive/pdf_files/EB113/seb11315a1.pdf)
- Rodríguez, A. (2015). *Alteraciones en el ciclo menstrual de adolescentes expuestas no ocupacionalmente a una mezcla de plaguicidas de una zona agrícola de San Luis Potosí. Estudio piloto*. (Tesis de Maestría) Posgrado en Ciencias Biomédicas Básicas. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.
- Schiavon-Ermani, R. y Villanueva-Jiménez, C. H. (2001) Alteraciones menstruales en la adolescencia. *Revista de endocrinología y nutrición*, 9 (3), 141-153.
- Toft, G., Axmon, A., Lindh, C., Giwercman, A. y Bonde, J. (2007). Menstrual cycle characteristics in European and Inuit women exposed to persistent organochlorine pollutants. *Human Reproduction*, 23(1), 193-200. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem349>

- Tresguerres, A., Coord. (2016). *Fisiología Humana* (3a ed.). España: McGraw-Hill.
- Valls-Llobet, C. (2011). Contaminación Ambiental y salud en las mujeres. *Investigaciones feministas*, 1, 149-159. Recuperado en <https://es.scribd.com/document/104533202/CONTAMINACION-AMBIENTAL-Y-SALUD-DE-LAS-MUJERES-Dra-Carmen-Valls-Llobet-2010>
- Vázquez, V., Martínez, A. y Díaz, E. (2005). Menarquía y ciclo menstrual en estudiantes internas y externas de ciudad de La Habana. *Revista Cubana de Salud Pública*, 31(4), 301-305. Recuperado en <http://scielo.sld.cu/pdf/rcsp/v31n4/spu06405.pdf>



---

## CAPÍTULO 6

### **ALTERACIONES DEL CICLO MENSTRUAL Y ESTABILIDAD CITOGÉNÉTICA EN MUJERES JORNALERAS DEL VALLE DE SAN QUINTÍN**

*María Evarista Arellano García, Christine von Glascoe,  
Lourdes Camarena, Concepción Martínez*

#### **INTRODUCCIÓN**

El presente estudio explora la asociación que existe entre la exposición ambiental y laboral a plaguicidas con la estabilidad citogenética y las posibles alteraciones en el ciclo menstrual de las mujeres jornaleras que residen y trabajan en el valle agrícola de San Quintín, Baja California.

Este valle es un polo de atracción para la población del resto del país, tanto por su dinámica económica como por su ubicación geográfica cercana al mercado estadounidense. Su producción principal consiste en bayas y hortalizas, para consumo nacional y para exportación, las cuales requieren aplicaciones sistemáticas de plaguicidas para asegurar las cosechas.

El trabajo agrícola de esta región se ha feminizado durante las últimas dos décadas, al registrar actualmente casi la misma proporción de mujeres y hombres en la composición de su fuerza de

trabajo. Sin embargo, a pesar de la importante contribución económica de la fuerza laboral femenina, existen pocos estudios sobre los efectos de la exposición a plaguicidas en la salud de las jornaleras, y menos aún sobre los posibles impactos en su salud reproductiva.

El propósito de este estudio fue indagar sobre los posibles efectos en la salud reproductiva de las mujeres jornaleras expuestas a plaguicidas, enfocándose en las alteraciones de su ciclo menstrual. Para ello, se emplearon diversas técnicas; se combinó la aplicación de un cuestionario sobre las características de sus ciclos menstruales con mediciones morfométricas y técnicas de laboratorio diseñadas para detectar la citotoxicidad y genotoxicidad (Bonassi *et al.*, 2011a, p. 89) presentes en las muestras de células bucales de cada participante. Se analizó la información de las variables con técnicas estadísticas multivariadas que permiten explorar y detectar asociaciones entre variables cualitativas y cuantitativas (Carey, 1993, p. 309).

Se reportó la asociación entre las molestias y alteraciones del ciclo menstrual con las características de exposición ambiental y ocupacional a los agroquímicos y la estabilidad cito/genotóxica en un grupo de 32 mujeres en edad reproductiva. Se relacionó el daño citotóxico y genotóxico en células de epitelio bucal con distintos cambios en el ciclo menstrual.

Se asume que las características del ciclo menstrual pueden ser un evento centinela importante y útil para prevenir daños a la salud reproductiva de esta población. La incorporación de mujeres jornaleras en los campos de cultivo las expone laboral y ambientalmente a una gama de agroquímicos que han sido identificados como disruptores endócrinos capaces de provocar cambios en el ciclo menstrual, ya sea porque interfieren en la secreción de hormonas o porque estos compuestos mimetizan los efectos de los estrógenos. La estabilidad citogenética se define como la capacidad del organismo para regular, mediante el proceso de muerte celular programada, el daño genotóxico que resulta de la exposición a sustancias tóxicas (Gotlib, Serebriany, Chernikova, Kudriashova y Pelevina, 1996, p. 975; Schwartz y Rotter, 1998, p. 326). Cuando

un grupo de personas presenta inestabilidad citogenética se puede inferir que algunos de sus procesos biológicos se encuentran en riesgo, sobre todo, aquellos que dependen directamente de un ciclo celular como es el ciclo menstrual (Krol, Lankoff, Buraczewska, Derzinska y Wojcik, 2007, p. 483), principalmente en lo que respecta al acortamiento de este (Lin *et al.*, 2013, p. 47).

El ciclo menstrual es un tema importante de investigación, independientemente de la cultura o época que se analice, ya que abarca aspectos variados desde la perspectiva biopsicosocial, cultural y antropológica. Además, actualmente el énfasis en los derechos humanos y en los aspectos medioambientales que le competen, abre perspectivas de aproximación interesantes. En cuanto a los derechos humanos, tanto el derecho a la privacidad como el derecho de las mujeres a vivir una menarca y menstruación con higiene y dignidad, libre de toda estigmatización, son abordados desde diversos puntos de vista (Marván, Cortés y González, 2014, p. 90).

La menstruación en su sentido más amplio es parte de un proceso biopsicosocial que se vincula con percepciones, saberes, emociones, sentimientos y comportamientos, además de ser un evento del desarrollo biológico que manifiesta la fertilidad femenina (Yazbek, Tezoto, Cassas, y Rodrigues, 2016, p. 315; Marván *et al.*, 2014, p. 89). En torno a la percepción, es importante tomar en cuenta las normas culturales, ya que son determinantes en las actitudes que asumen las abuelas, madres e hijas hacia la menstruación a través de las generaciones; se sabe que las experiencias de las mujeres de la generación anterior suelen ser menos positivas que las de sus hijas (Strauss, Appelt, Daub, y Vries de, 1990, p. 50). Algunas investigaciones señalan que las actitudes negativas sobre la menstruación y la menarca sobrepasan a las positivas, debido a que ambos procesos provocan en las mujeres ansiedad, pérdida de la libertad y de control, así como disminución de la autoestima (Langer, 1944, p. 212; Stubbs, 2008, p. 62). Hombres y mujeres albergan más creencias negativas que positivas hacia la menstruación, las cuales están asociadas principalmente a síntomas físicos poco placenteros, mal



humor, debilitamiento del desempeño físico, también temor, vergüenza y preocupación que son reflejo de las pautas culturales que persisten al respecto (Golub, 1976, p. 102). Los tabúes y secrecía que rodean a la menstruación y a la menarca en muchas culturas han sido documentados por varias(os) autores y algunos los han explicado como un reflejo del gran poder que tradicionalmente se le ha dado a la sangre femenina, aunque no hay un término preciso que acote la definición de este poder (Amberston, 1991, citado en González, 2011, p. 29; Mason *et al.*, 2013, p. e79132); en este sentido, Simone de Beauvoir describe y analiza la importancia de la sangre menstrual desde distintas aristas, que van de la perspectiva biológica a sus implicaciones socioculturales (Beauvoir de, 1949, pp. 14 y 18).

Específicamente la menarca o edad de la primera menstruación es el evento que marca el inicio de la maduración sexual (Alarcón-Nivia, Alarcón-Amaya. y Blanco-Fuentes, 2006, p. 20). Desde el punto de vista biológico el ciclo menstrual es un proceso femenino regulado por la interacción de proteínas secretadas de manera sincronizada entre el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios; el primero, localizado en la parte más interna del cerebro, libera proteínas que estimulan la secreción de hormonas gonadotrópicas por parte de la hipófisis, glándula ubicada también en el cerebro en posición subyacente al hipotálamo (Hawkins y Matzug, 2008, p. 12). Estas secreciones liberadas al torrente sanguíneo, promueven la producción de estrógenos y progesterona, hormonas estimuladoras del ciclo ovárico que abarca la maduración de los ovocitos y liberación de los óvulos, lo cual puede resultar en la implantación de un óvulo en el útero después de la fecundación; o bien, cuando no hay fecundación, se degrada el óvulo y se dejan de producir estrógenos y progesterona (Ghisari, Long, Tabbo, y Bonefeld-Jørgensen 2015, p. 293). Como consecuencia, las capas superficiales del endometrio que recubren al útero se desprenden y son expulsadas al exterior por la vagina, lo que se conoce como menstruación o sangrado menstrual. La sincronización en la acción o inacción de las hormonas en

las fases del ciclo ovárico, que están reguladas químicamente por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario puede alterarse por diversos factores, como la exposición a los plaguicidas.

## PLAGUICIDAS Y SALUD REPRODUCTIVA

Los plaguicidas actúan dentro del cuerpo humano principalmente a través de tres mecanismos, el primero mediante la transformación dentro del cuerpo de estas sustancias en metabolitos tóxicos, a lo que se le denomina biotransformación y puede provocar diversos síntomas de intoxicación (Maroni y Bersani, 1994, p. 49); el segundo, consiste en la interferencia de los plaguicidas en el ciclo celular normal, lo cual se traduce en citotoxicidad o genotoxicidad (Ouyang *et al.*, 2005, p. 879) y el tercero reside en la interferencia de estas sustancias en los procesos de secreción de las hormonas necesarias para la función celular, por lo que se les atribuye la capacidad de ser disruptores endócrinos (Gore, 2002, p. 157). Se ha identificado que los plaguicidas pueden interferir en la síntesis, almacenamiento y liberación de hormonas, en los mecanismos de transporte, en el reconocimiento y unión hormonal, así como en la inactivación post-recepción de la activación. Otra forma de actuar como disruptores hormonales consiste en interferir en el funcionamiento de la glándula tiroides y el sistema nervioso. (Ghisari *et al.*, 2015, p. 301; Maroni y Bersani, 1994, p. 50)

Los mecanismos antes citados tienen la capacidad de causar diversos efectos en la salud reproductiva, como cambios en los niveles de las hormonas sexuales e irregularidades en el ciclo ovárico (Attarchi *et al.*, 2013, p. 163; Toft, Axmon, Lindh, Giwerchman y Bonde, 2008, p. 193); también se sabe de consecuencias en la fertilidad tales como abortos espontáneos, óbitos y nacimientos prematuros; además, se conoce que los plaguicidas pueden afectar el desarrollo embrionario, ocasionar bajo peso al nacer y diversos defectos al nacimiento (Toft *et al.*, 2010, p. 1)

Distintos autores han relacionado efectos de los plaguicidas con alteraciones del ciclo menstrual, como la dismenorrea o la variación de los días de sangrado. Cho *et al.*, (2001, p.568) estudiaron la asociación entre exposición a solventes orgánicos y la oligomenorrea, y mencionan que 7% de la población expuesta a solventes tiene falta de sangrado por más de 35 días, y a medida que el tiempo de exposición aumenta, el porcentaje de población con oligomenorrea se incrementa hasta 53 % después de tres años de exposición. Concluyen que la exposición a solventes orgánicos se asocia con un aumento de la frecuencia en oligomenorrea. Buck *et al.* (2011, p. 1742), y Lin *et al.* (2012, p. 45) demuestran claramente que los compuestos orgánicos tienen capacidad de interferir en la longitud del ciclo menstrual y en otras molestias premenstruales.

**Tabla 1. Plaguicidas de más amplio uso en la región, verificados como disponibles para su venta por medio de entrevista telefónica a los distribuidores locales\***

Usos	Grupo químico	Concentración %	EPA clasificación	Toxicidad <sup>b</sup>	Mecanismo de acción
<b>Organofosforados</b>					
Insecticida	Diazinon	25-90	no es probable	IV	Inhibe la acetilcolinesterasa y es agente alquilante del adn, clasificados como carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos
	Azinfos metílico	35	no es probable	I	
	Malatión	90	Evidencia	IV	
	Dimetoato	40	C	II	
	Metamidofos	39.6-48.3	E	IB	
Herbicida	Bensulida	125	no es probable	III	
	Glifosato	48	E	IV	
<b>Carbamatos</b>					
Insecticida	Metomilo	90	E	IB	Inicio rápido; inhibe la acetilcolinesterasa y otras enzimas
	Oxamil	24-42	E	IA	
Fungicida	Mancozeb	56.4-80	B2	III	
	Maneb	75-80	B2	III	
<b>Organoclorados</b>					
Insecticida	Endosulfan	25-48	no es probable	I	Antagonista de receptores GABA, inhibe canales de Ca <sup>2+</sup> y Mg <sup>2+</sup>

Usos	Grupo químico	Concentración %	EPA clasificación <sup>a</sup>	Toxicidad <sup>b</sup>	Mecanismo de acción
<b>Piretroides</b>					
Insecticida	Permetrina	34-48	C	IB	Afecta canales de Na <sup>+</sup>
	Bifentrin	10	C	II	
<b>Biperidiles</b>					
Herbicida	Paraquat	24	C	IA	Interfiere en la transmisión de electrones e inhibe la reducción de NADP a NADPH durante la fotosíntesis, con la formación de radicales superoxidados
<b>Otros</b>					
Fungicida	Oxycloruro de Cobre	85.0	D	III	Mecanismo de acción no claramente establecido
	Clorotalonil	54	Probable	IV	

<sup>a</sup> Clasificación EPA: A, carcinógeno humano; B, probable carcinógeno humano; B1, evidencia limitada de carcinogenicidad de estudios epidemiológicos ; B2, suficiente evidencia de estudios en animales; C, posible carcinógeno humano; D, no clasificable para carcinogenicidad humana; E, evidencia de no carcinogenicidad en humanos; nd, sin datos disponibles; evidente, indica evidencia de carcinogenicidad, pero no suficiente para asegurar que sea carcinógeno potencial en humanos; probable, probablemente sea carcinógeno en humanos; no es probable, no es probable que sea carcinógeno en humanos. <sup>b</sup> Clasificación OMS: IA—extremadamente tóxico; IB—altamente tóxico; II—moderadamente tóxico; III—ligera-mente tóxico; Improbable que presente peligro [36]. \*El ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) neurotransmisor inhibidor en el sistema nervioso central (SNC). En humanos, GABA es directamente responsable de la regulación del tono muscular.

\* Modificado de Zúñiga-Violante *et al.*, 2009, con permiso de sus autoras(es).

Desde mediados del siglo pasado, la aplicación de plaguicidas en las zonas agrícolas de todo el mundo, incluido Baja California, ha sido constante. De acuerdo con las estimaciones hechas por la Red de Acción sobre Plaguicidas (PAN por sus siglas en inglés), cada año se aplican cerca de medio millón de toneladas de diversos plaguicidas en Estados Unidos (PAN, 2016). En México, la costumbre de no llevar registros sobre volúmenes de aplicación de plaguicidas, desafortunadamente, dificulta estimar la magnitud real del uso de estas sustancias en la producción de alimentos y en el control de vectores de enfermedades; especialmente en Baja California, las autoridades federales, estatales y municipales reiteradamente han omitido esos registros.

Biomonitoreos en las zonas agrícolas de Baja California muestran diferentes efectos sobre la salud de hombres y mujeres expuestos laboral y ambientalmente a plaguicidas (tabla 1). Zúñiga-Violante *et al.*, (2012, p. 93), señalan específicamente cómo el tiempo de exposición a plaguicidas se relaciona positivamente con daño genotóxico en residentes del valle de San Quintín. Montañón-Soto, Arellano-García, Camarena-Ojinaga, Ruiz-Ruiz y Von-Glacoce (2014, p. 90) explican, en un biomonitoreo, cómo las mujeres que trabajan en el campo tienen más daño genotóxico que personas no expuestas laboralmente. Castañeda-Yslas *et al.* (2016, p. 6) sugieren que la exposición de las jornaleras del valle de Maneadero, Baja California puede tener efectos transgeneracionales. Considerando que las jornaleras en la zona de San Quintín están expuestas laboral y ambientalmente a una mezcla compleja de plaguicidas con diferentes grados de toxicidad, se analizó la relación entre diversas alteraciones del ciclo menstrual con la exposición laboral y otros aspectos que contribuyen a potenciar los efectos en su salud, como el tiempo de exposición ocupacional y el tiempo de residencia en el lugar. Con el fin de resolver esas dudas se aplicó un cuestionario para recopilar las diferentes molestias relacionadas con el ciclo menstrual, se tomaron datos morfológicos y se analizó el daño genotóxico y citotóxico en células del epitelio bucal con base en el ensayo de micronúcleos (Bolognesi, Knasmueller, Nersesyan, Thomas y Fenech, 2013, p. 101).

## CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

El presente estudio exploratorio, de corte principalmente cuantitativo transversal y correlacional, requirió del uso de varias técnicas (Sinobas, 2011, p. 84) La primera consistió en el desarrollo y aplicación de un cuestionario con preguntas abiertas y cerradas, cuya finalidad fue explorar diferentes aspectos sobre la menstruación, el ciclo menstrual y la salud reproductiva de mujeres jornaleras del

valle de San Quintín. También se obtuvieron datos demográficos y de exposición ocupacional a plaguicidas. La segunda consistió en la obtención de información morfológica, muestras de mucosa bucal, datos de glicemia con glucómetro manual y de tensión arterial con baumanómetro digital. Una vez obtenida la información se estructuró una base de datos en Excel® sobre la cual se aplicaron métodos estadísticos multivariados y se correlacionaron las características del ciclo menstrual de estas mujeres con la exposición ocupacional a plaguicidas y otros datos clínicos como la glicemia, tensión arterial, índice de masa corporal y nivel de daño genotóxico y citotóxico en células de epitelio bucal.

El grupo estudiado se formó con 32 mujeres jornaleras quienes firmaron su consentimiento informado para responder al cuestionario, proporcionar muestras de epitelio bucal y permitir la medición de su glicemia, presión arterial, peso, estatura y diámetro de la cintura.

En su mayoría 14 (44%) proceden del estado de Oaxaca, aunque 13 (41%) ya son nacidas en Baja California; las demás vienen de los estados de Sinaloa 2 (6%), Chiapas 1 (3%), Jalisco 1 (3%) y Guerrero 1 (3%).

Muchas de ellas no estudiaron o no terminaron la primaria 14 (44%), solo 8 (25%) completaron la primaria, 7 (22%) concluyeron la secundaria, 2 (6%) tienen educación media superior, y una de ellas (3%) terminó la licenciatura.

En cuanto al tiempo de residencia en la zona, 5 (15%) tienen menos de diez años de vivir en San Quintín, el resto (85%) tiene entre diez y 24 años de vivir en el sitio.

### **Técnica de citotoxicidad y genotoxicidad en mucosa bucal**

Para tomar las muestras de epitelio bucal a cada participante se le pidió que se enjuagara la boca tres veces con agua potable, para lo cual se le proporcionó una botella sellada; después se procedió a

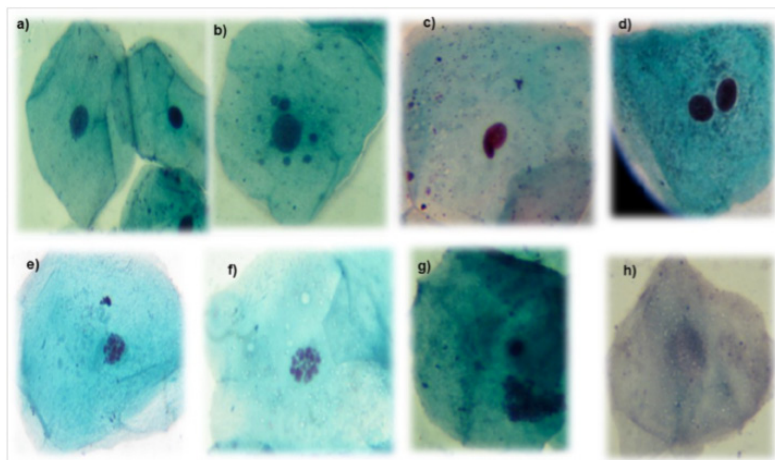
limpiar dos portaobjetos en los cuales se grabó un código de referencia para su identificación. Se talló suavemente la mejilla derecha por dentro de la boca y con el material raspado se aplicó un extendido sobre el portaobjetos previamente etiquetado. Se repitió el procedimiento con la mejilla izquierda para disponer de dos muestras y asegurar al menos una en caso de ruptura o pérdida de cualquiera de ellas. Las muestras se secaron al aire libre y se envolvieron en gasas para su traslado al laboratorio.

### **Procedimientos de laboratorio**

Una vez en el laboratorio, los portaobjetos con muestras de epitelio bucal se sumergieron en etanol al 80 % en cubas de tinción durante 48 horas; una vez que las células se fijaron al portaobjetos, se tiñeron en orceína por dos horas y se lavaron. Después se contratiñeron con verde rápido durante 10 minutos, se lavaron en agua corriente y se dejaron secar al aire para posteriormente leerse al microscopio óptico Carl Zeiss Modelo (Axio Star) con objetivo 100 X, siguiendo los criterios descritos por Bolognesi *et al.*, (2013, pp. 100-113) como lo muestra la figura 1.



**Figura 1. Morfología de células de epitelio bucal y diversas anomalías nucleares con tinción de orceína y verde rápido a 100X.**



a) normal, b) con micrónúcleos, c) con núcleo lobulado, d) binucleada e) Cromatina condensada, f) Cariorrexis, g) Picnosis, h) Cariólisis, (Micrografías por Idalia Castañeda©).

La observación de las células de epitelio bucal en el microscopio óptico con objetivo de inmersión 100X permite identificar en su morfología el daño genotóxico y el daño citotóxico causados por la exposición reciente de una persona a tóxicos (entre siete y 21 días). El daño genotóxico refleja la interacción del tóxico con el ADN, mientras que el daño citotóxico muestra el proceso de muerte celular que ocurre cuando una célula detecta un daño en su estructura y se desencadena un mecanismo de muerte que puede ser muy ordenado e inocuo como la apoptosis, o bien, un proceso violento e inflamatorio como la necrosis.

Comparativamente con una célula epitelial normal (figura 1a), las imágenes con células que tienen micrónúcleos (figura 1b), o presentan brotes nucleares (figura 1c), o bien, tienen dos núcleos en el mismo citoplasma (figura 1d) corresponden a daño genotóxico. En cambio, el daño citotóxico está representado por los estadios celulares en proceso de muerte celular como la cromatina anormalmente condensada (figura 1e), la cariorrexis, donde el núcleo

aparece vacuolado (figura 1f), la célula en picnosis (figura 1g), estadio en el que desaparece la membrana nuclear y finalmente la cariólisis (figura 1h), en la que el núcleo celular está prácticamente ausente o tiene una apariencia de fantasma. Después de contar 2000 células al microscopio, la suma de células con micronúcleo (MN), binucleadas (BN) y con brotes nucleares (Buds) constituyen el daño genotóxico DG, en tanto que la suma de las células con cromatina condensada (CC), cariorrexis (CR), picnosis (PN) y cariólisis (CL) componen el daño citotóxico. La estabilidad citogenética (EC) se define como el equilibrio del número de células con daño genotóxico menos el número de células con daño citotóxico en un conteo de 2000 células de epitelio bucal; si EC es cero, la persona presenta estabilidad citogenética; es decir, las mismas células que tienen daño genotóxico van a tener oportunidad de una muerte celular programada o apoptosis. En cambio si EC es menor que cero, significa que la persona presenta inestabilidad citotóxica, es decir hay más células muriendo o suicidándose que aquellas que presentan un daño genotóxico; pero si EC es mayor a cero, la persona presenta inestabilidad genotóxica, porque hay menos muerte celular programada que daño genotóxico y estas células dañadas podrán seguir reproduciéndose a pesar de tener daño en su ADN, lo cual significa que independientemente de los procesos hereditarios de susceptibilidad individual, hay una respuesta de deterioro genético por efectos ambientales (Castañeda-Yslas *et al.*, 2016, p. 6)

### **Análisis estadístico**

Se sistematizó la información obtenida con la aplicación de los cuestionarios. Se registraron los siguientes datos: peso, estatura, edad, glicemia, características del ciclo menstrual y los resultados de laboratorio. Posteriormente, se procedió a preparar una hoja electrónica de datos, que se exportaron al programa Stat-Soft®, para realizar una descripción detallada de cada una de las variables

consideradas. Se efectuaron análisis multivariados de carácter exploratorio y un análisis de Factores, (*FA, Factor Analysis*), con base en tres grandes grupos de variables: 1) de exposición laboral y ambiental, 2) del ciclo menstrual y 3) de salud reproductiva, para revisar la asociación de estas con la estabilidad citogenética (EG) y, finalmente, realizar un análisis de factores para verificar el peso relativo de la asociación entre ellas.

Los algoritmos estadísticos de los análisis multivariados en general, y de agregamiento (AA) y por factores (FA) en particular, permiten revelar información asociativa que se encuentra imbricada en conjuntos grandes de variables cuantitativas discretas y continuas, así como de aquellas expresadas en escalas ordinales y nominales (Blanco, Vicente de y Manera, 2000, p. 38). Esta metodología estadística permite clasificar conjuntos de variables (columnas), mediante la extracción de la variabilidad inmersa entre los sujetos considerados (renglones). Con base en estos algoritmos se desarrolló el árbol asociativo de las variables o dendrograma y se extrajeron dos factores ortogonales sobre los que se ubicaron las variables con mayor asociación, los cuales se presentan a continuación.

## **PRINCIPALES HALLAZGOS**

En cuanto a la información sociodemográfica y de exposición, la mayor parte de las mujeres son migrantes del estado de Oaxaca (44%), o bien, ya nacieron en Baja California (41%) y viven en la región de San Quintín desde hace más de 20 años (89%), trabajando en labores del campo (81%). En cuanto a la escolaridad, una gran proporción (44%) no estudió o abandonó la escuela antes de terminar la primaria; el resto concluyó algún ciclo educativo (tabla 2).

**Tabla 2. Información laboral y sociodemográfica**

Variable	Categoría	Número de mujeres	Porcentaje %
Estado de procedencia	Oaxaca	14	44
	Baja California	13	41
	Sinaloa	2	6
	Chiapas	1	3
	Jalisco	1	3
	Guerrero	1	3
Escolaridad	No estudió	4	13
	Primaria incompleta	10	31
	Primaria completa	8	25
	Secundaria	7	22
	Preparatoria completa	2	6
	Licenciatura	1	3
Años de vivir en San Quintín	1 a 4	2	6
	5 a 9	3	9
	10 a 14	5	16
	15 a 19	7	22
	20 a 24	2	6
	25 o más	13	41
Trabajó antes	Sí	28	88
	No	4	13
Tipo de trabajo anterior	Campo	26	81
	Negocio	1	3
	No aplica	4	13
	No contestó	1	3
Años en el trabajo anterior	1 a 3	8	25
	4 a 6	4	13
	10 a 12	3	9
	13 a 15	4	13
	16 a 18	2	6
	19 a 21	2	6
	No aplica	4	13
	No contestó	5	16

Fuente: Elaboración propia

Con relación a la morfometría, la edad promedio fue de  $28.2 \pm 9.7$  años; la media del peso se situó en  $67.7 \pm 15.2$  kilos. La media de talla promedio fue de  $1.5 \pm 0.1$  metros, con lo que se calculó el índice de masa corporal (IMC) que resultó en una media de  $31.7 \pm 8.2$   $\text{kg m}^2$ , cifra que es consistente con obesidad grado I. El promedio del diámetro de la cintura fue  $91.7 \pm 19.9$  centímetros y el de glicemia de  $104.2 \pm 15.7$ , lo cual permite señalar que este grupo de mujeres no tiene indicios de padecer diabetes mellitus tipo 2, asimismo, el promedio de presión arterial de  $115.3 \pm 15.7/74.3 \pm 8.5$  deja ver que tampoco padecen de hipertensión arterial (tabla 3).

Según los reportes de las mujeres de este grupo, la menarca les ocurrió en promedio a los  $12.2 \pm 1.6$  años, el número de sus periodos en los últimos seis meses, fue en promedio  $4.2 \pm 2.1$ , con adelantos en el número de días de  $4.7 \pm 5.2$  días, lo que indica una marcada irregularidad del periodo menstrual. Las mujeres del estudio tuvieron en promedio entre dos y tres hijas(os) ( $2.6 \pm 2.1$ ), 70% nacieron por parto, 29% por cesárea y 1 % tuvo abortos. Con respecto al sexo de sus bebés, se conservó la proporción de 50% niñas y 50% niños, que pesaron en promedio  $3.3 \pm 0.6$  kilos, la mayoría fue amamantada al seno materno.

En lo que se refiere a las características del ciclo menstrual (tabla 4), el padecimiento más frecuente entre las mujeres del estudio fueron las molestias premenstruales (78%) tales como dolor en el abdomen, la cintura, cefaleas, cólicos, dolor en los senos y en segundo término, los sangrados dolorosos (44%). Más de la mitad reportó tener ciclo regular (56%), aunque una alta proporción (34%) dijo tener ciclos irregulares; 66% señaló cambios en los días del ciclo. En cuanto a los días de atraso de la menstruación, algunas (19%) mencionaron como máximo entre tres y seis días; en cambio, 28% percibieron que el menor número de días de atraso es entre dos y cinco días. Por su parte, 28% de las entrevistadas dijo que los días de adelanto fluctúan entre uno y tres días.

**Tabla 3. Estadística descriptiva de las variables cuantitativas del estudio**

	Variable	n	Promedio	Valor mínimo	Valor máximo	Desviación estándar
<b>Morfometría</b>	Peso en kilos	32	67.7	42.0	106.0	15.2
	Talla en metros	32	1.5	1.4	1.6	0.1
	Diámetro cintura cm	30	91.7	26.0	119.0	19.9
	Índice de masa corporal	32	31.7	21.5	54.1	8.2
	Presión sistole	27	115.3	88.0	155.0	15.7
	Presión diástole	27	74.3	60.0	95.0	8.5
	Glicemia m g dL-l	31	104.2	76.0	133.0	15.7
	Edad	32	28.2	12.0	48.0	9.7
	Talla en metros	32	1.5	1.4	1.6	0.1
<b>Salud reproductiva</b>	Menarca	30	12.2	10.0	17.0	1.6
	# periodos en 6 meses	29	4.2	0.0	6.0	2.1
	Menor # de días de adelanto	19	4.7	0.0	15.0	5.2
	# Embarazos	25	2.6	0.0	9.0	2.1
	Cesárea	31	0.3	0.0	2.0	0.5
	Parto	31	0.7	0.0	6.0	1.5
	Aborto	31	0.1	0.0	2.0	0.4
	Vivo	31	1.1	0.0	6.0	1.6
	Niñas	31	0.5	0.0	3.0	1.0
	Niños	31	0.5	0.0	4.0	1.0
	Niñas(os) que amamantó	31	1.1	0.0	6.0	1.6
	Peso al nacer	14	3247.1	1600.0	3900.0	589.6
<b>Cito-Genotoxicidad</b>	Micronúcleos (MN)	32	2.5	0.0	9.0	2.2
	Binucleadas (BN)	32	4.7	1.0	13.0	2.9
	Lobuladas (LB)	32	4.0	0.0	18.0	3.7
	Daño genotóxico	32	21.8	9.0	64.0	12.5
	Cariólisis (CL)	32	3.5	0.0	18.0	5.0
	Cariorrexis (CR)	32	6.6	0.0	46.0	10.0
	Cromatina anormalmente condensada (CC)	32	4.4	0.0	41.0	8.6
	Picnosis	32	4.8	0.0	26.0	5.1
	Basales (BS)	32	10.7	0.0	53.0	11.4
	Daño citotóxico (DC)	32	19.2	1.0	80.0	21.1
	Equilibrio Cito/genotóxico	32	2.6	-62.0	44.0	21.0

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 4. Características del ciclo menstrual**

Variable	Categoría	Jornaleras	Porcentaje %
Sangrados dolorosos	Sí	14	44
	No	16	50
	No aplica	2	6
Molestias premenstruales	Sí	25	78
	No	5	16
	No aplica	2	6
Regularidad del ciclo	Irregular	11	34
	Regular	18	56
	No aplica	2	6
	No contestó	1	3
Cambio en los días del ciclo	Sí	19	66
	No	12	34
Máximo tiempo de atraso	1 a 3 días	3	9
	3 a 6 días	6	19
	2 a 3 semanas	3	9
	1 a 2 meses	4	13
	3 meses	1	3
	4 a 5 meses	2	6
	No aplica	9	28
	No contestó	4	13
Menor número de días de atraso	1	1	3
	2 a 5	9	28
	6 a 8	1	3
	30	4	13
	No aplica	11	34
	No contestó	6	19
Máximo número de días de adelanto	1 a 3	9	28
	4 a 6	1	3
	7 a 10	1	3
	10 a 13	1	3
	14 a 17	3	9
	No aplica	13	41
	No contestó	4	13



Variable	Categoría	Jornaleras	Porcentaje %
Número de días de sangrado	3 a 4	15	47
	5 a 6	13	41
	6 a 7	1	3
	No aplica	2	6
Cambios en los días de sangrado	Sí	11	34
	No	19	59
	No aplica	2	6
Días de sangrado más largos	3 a 5	6	19
	6 a 8	5	16
	6 a 7	1	3
	12 a 15	1	3
	No aplica	18	56
Días de sangrado más cortos	3 a 5	7	22
	6 a 8	6	19
	No aplica	18	56
	No contestó	1	3
Embarazos	Sí	23	72
	No	8	25
	No aplica	1	3
Uso de métodos anticonceptivos	Sí	13	42
	No	14	45
	No aplica	1	3
	No contestó	3	10
Estabilidad citogenética	Estabilidad	2	6
	Inestabilidad cito-tóxica	9	28
	Inestabilidad geno-tóxica	21	66

Fuente: elaboración propia

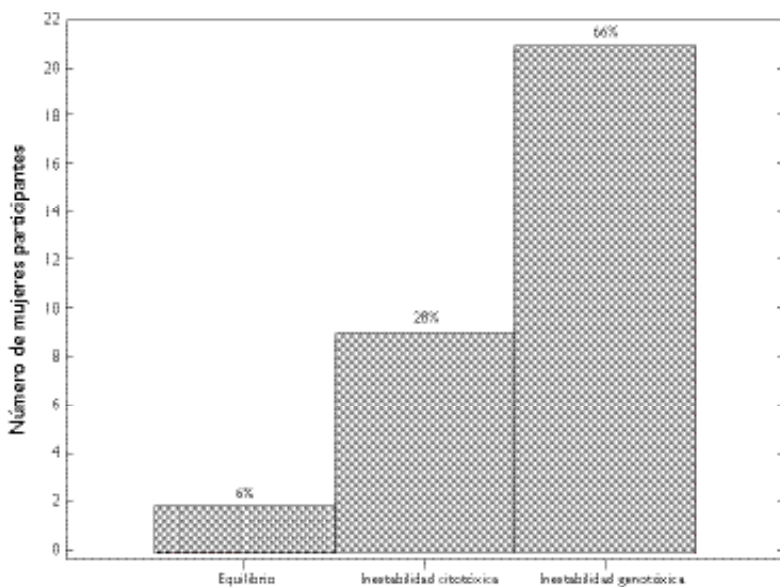
En lo que respecta a los cambios en la duración de los días de sangrado, más de la tercera parte (34%), mencionó que padece este tipo de trastornos. El 47% indicó que el sangrado dura entre tres y cuatro días, mientras que 41% declaró que entre cinco y seis días; algunas (16%) reconocieron que los sangrados más largos que han

tenido duran entre seis y ocho días. Por otro lado, 19% reporta que los sangrados más cortos han durado entre seis y ocho días.

La mayoría (72%) ha tenido algún embarazo, mientras que solo 42% utiliza algún método anticonceptivo; principalmente toman anticonceptivos hormonales o se han practicado salpingoclasia, en tanto que el uso del condón es poco frecuente.

La estabilidad citogenética solo se presenta en un reducido porcentaje de las mujeres participantes (6%), mientras que 28% presentan procesos de muerte celular por encima de la genotoxicidad, lo que refleja una inestabilidad citotóxica, aunque en la mayoría (66%) el daño genotóxico es superior a la muerte celular, lo cual sugiere que células con daño al ADN van a seguir reproduciéndose con ese deterioro en el epitelio, como se muestra en la figura 2.

**Figura 2. Estabilidad citogenética**

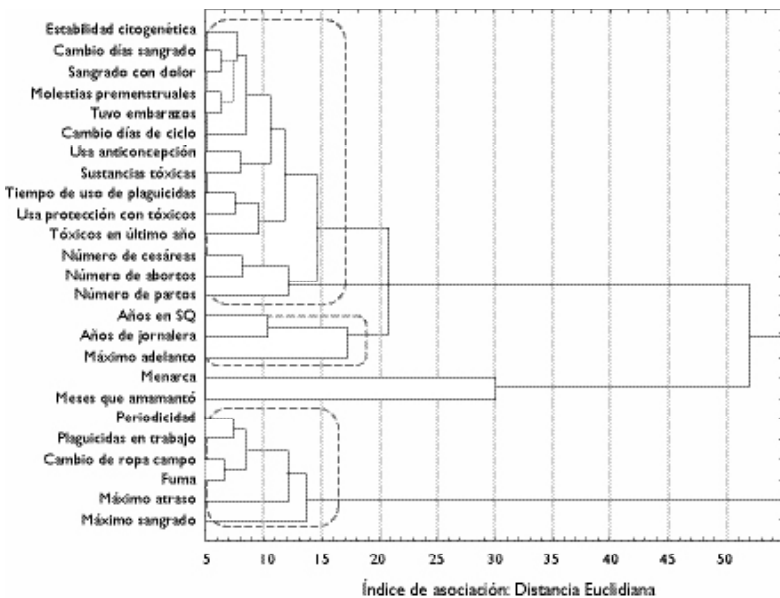


Fuente: Elaboración propia

El análisis de agregamiento muestra la asociación entre las variables de exposición, las de salud reproductiva, las de daño genotóxico y

las morfométricas adicionales con base en la distancia euclidiana como medida de agregamiento. En la figura 3 se aprecian tres conjuntos de variables. El primero y más grande se conformó a diez unidades de distancia; en él se agruparon junto con la estabilidad citogenética diez variables de salud reproductiva y de exposición: uso de sustancias tóxicas, tiempo de uso de plaguicidas, uso de protección con tóxicos y uso de tóxicos en el último año. Respecto a la salud reproductiva se asociaron a este primer grupo las siguientes variables: cambio en los días de sangrado, sangrado con dolor, molestias premenstruales y tuvo embarazos, relacionadas con la reproducción como embarazos, uso de anticonceptivos y número de cesáreas, abortos y partos.

**Figura 3. Dendrograma de asociación entre las variables con base en el índice de distancia euclidiana como medida de asociación**



Fuente: elaboración propia

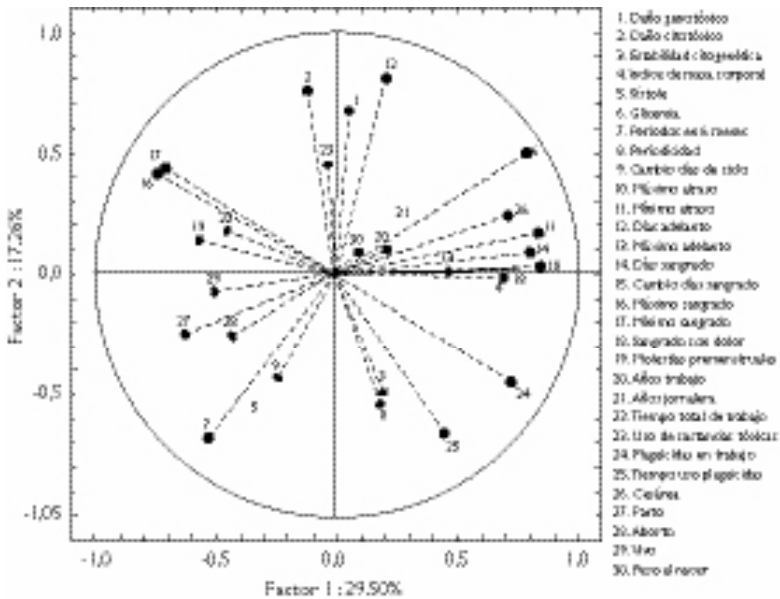
El segundo grupo de variables se asociaron alrededor de las doce unidades de distancia, entre las cuales se resalta el uso de

plaguicidas en el trabajo y el cambiarse de ropa después de realizar labores del campo, que se relacionó con la periodicidad del ciclo menstrual, el máximo número de días de atraso en la menstruación y el máximo de días de sangrado junto con el tabaquismo. El tercer grupo que se aglomeró a catorce unidades de distancia estuvo conformado por variables tales como años de vivir en San Quintín y años como jornalera que se relacionaron con el máximo adelanto en la menstruación.

El análisis de agregamiento permite señalar que la estabilidad citogenética, las variables de exposición ambiental y laboral a los plaguicidas, así como las características del ciclo menstrual están relacionadas, como lo mencionan Ouyang *et al.* (2005, p. 883), quienes han señalado que los plaguicidas interfieren en el ciclo celular normal. Además refuerza lo establecido por Gore (2002, p. 157) acerca de cómo los plaguicidas interfieren en los procesos de secreción de hormonas necesarios para la función celular, lo cual produce irregularidades en el ciclo ovárico.

Para una apreciación más certera se practicó un análisis de componentes principales con los grupos de variables más notables del dendrograma de la figura 4. Se representaron los cuatro sectores de los dos factores ortogonales que extrajeron la mayor variación, las siguientes variables: en el primer cuadrante el daño genotóxico se asoció con la glicemia, los atrasos y adelantos de la menstruación, los años de trabajo en el campo, la frecuencia de cesárea y el peso al nacer. Este hallazgo confirma lo establecido por Cooper, Klebanoff, Promislow, Brock y Longnecker (2005, p.191), quienes mostraron claramente la correlación entre el ciclo menstrual y los compuestos orgánicos persistentes.

Figura 4. Análisis de componentes principales



Fuente: Elaboración propia

En el segundo cuadrante de componentes principales, se reúnen con la estabilidad citogenética las siguientes variables: índice de masa corporal, periodicidad del ciclo, cambio en los días de sangrado, uso de plaguicidas en el trabajo y el tiempo de uso de plaguicidas. Este hallazgo corrobora nuevamente que el tiempo de exposición afecta la salud de las mujeres en general como lo revelan Zúñiga-Violante *et al.* (2012, p. 99), quienes encontraron una relación directa entre el tiempo de exposición laboral y ocupacional a los plaguicidas en mujeres del valle de San Quintín que coincide con los resultados de Montaña-Soto *et al.* (2014, p. 89) con mujeres del valle de Maneadero.

El tercer cuadrante muestra una asociación de la presión arterial sistólica con el número de periodos en los últimos seis meses, cambio en los días del ciclo, número de partos, abortos y niños nacidos vivos, lo cual no tiene relación ni con la exposición a

plaguicidas ni con la estabilidad citogenética. En el último cuadrante el daño citotóxico se relacionó con máximos y mínimos en los días de sangrado, las molestias premenstruales, el tiempo total de actividad laboral y el uso de tóxicos en el hogar lo cual, si bien guarda una relación con la actividad laboral, esta no puede explicarse como reflejo del daño citotóxico. Lo anterior representa solamente la relación asociativa entre las variables consideradas, que explican un total de 47% de la variación total repartida en 30% del primer factor y 17% del segundo.

Estos resultados permiten señalar que hay una asociación entre las molestias y alteraciones del ciclo menstrual con las características de exposición ambiental y laboral a plaguicidas en las mujeres jornaleras del valle de San Quintín. La inestabilidad citogenotóxica tiene efectos principalmente en la longitud del ciclo menstrual y en las dismenorreas de las jornaleras, de forma que el trabajo agrícola es un factor de riesgo para su salud reproductiva. Es importante señalar que el autoreporte de los padecimientos menstruales puede ayudar en la vigilancia de la salud reproductiva de este grupo poblacional.

## CONCLUSIONES

Las condiciones precarias de vida y trabajo son de los aspectos mejor estudiados acerca de la población migrante indígena del valle de San Quintín (Garduño, Ovalle y Mata, 2011, p. 58). Esas condiciones, junto con el deterioro de la salud de este grupo poblacional como resultado de la aplicación de plaguicidas desde antes de 1960, cuyos residuos aún circulan en suelo, aire y agua (Robles, 2006 p. 442), han derivado en una compleja situación socio-laboral.

En este estudio se encontró una asociación significativa entre la estabilidad citogenética, la exposición ocupacional y ambiental a plaguicidas y los desórdenes menstruales; lo cual permite señalar que los biomarcadores de daño genotóxico pueden prever la

aparición de enfermedades postexposición como lo han señalado autores como Garte y Bonassi (2005), y Bonassi *et al.* (2011). Las correlaciones que se detectaron entre la exposición ambiental y laboral a plaguicidas con desórdenes en el ciclo menstrual coinciden con lo reportado por otras(os) autores, como sangrados intermenstruales y cambios en la longitud del ciclo menstrual que se asocian con la capacidad de los agroquímicos de tener actividad endócrina (Farr, Cooper, Cai, Savitz y Sandler, 2004, p. 1195). También Namulanda *et al.* (2016, p. 469) discuten la correlación entre la exposición *in utero* con el acortamiento de la menarca en niñas cuyas madres estuvieron expuestas durante el embarazo a plaguicidas; las mujeres de nuestro estudio tuvieron una menarca que se considera aceptable, no obstante, en algunos casos se presentó hacia los primeros años de la pubertad entre ocho y diez años de edad. Este aspecto es importante porque una menarca temprana es un factor de riesgo para el síndrome premenstrual, dismenorrea y cáncer de mama y ovario (Namulanda *et al.*, 2016 p. 469). Puesto que una alta proporción de las mujeres participantes en este estudio son hijas de madres jornaleras expuestas a plaguicidas durante las décadas de los años 70 y 80, es posible explicar muchos de los desórdenes menstruales que ellas reportan (Ouyang, *et al.*, 2005, p. 878; Farr *et al.*, 2004, p. 1195; Buck *et al.*, 2011, p. 1743; Gotlib *et al.*, 1996, p. 102).

Gore (2002, p. 157) y Ghisari *et al.* (2015, p. 292) han señalado que los plaguicidas pueden actuar sobre diversos mecanismos en la expresión de genes y en la dinámica celular, lo cual explica por qué se detecta la asociación entre la exposición a los plaguicidas con la estabilidad citogenotóxica en el grupo de mujeres participantes en el estudio. Cho *et al.* (2001, p. 567), explican claramente la relación de dependencia entre la oligomenorrea y la exposición a solventes orgánicos, tal como ocurre en algunas de las mujeres de San Quintín. Otro punto es el efecto de los plaguicidas como disruptores endócrinos (Gotlib *et al.*, 1996, p. 974; Gore, 2002, p. 157 y Ouyang *et al.*, 2005, p. 878) que actúan sobre diversos aspectos



como la dismenorrea, la menarca y la periodicidad del ciclo menstrual, detectados en las mujeres participantes en el presente estudio.

En términos de normatividad y regulación, en la relación entre plaguicidas y salud solo se han considerado las consecuencias agudas, ya que los registros oficiales dan cuenta de las intoxicaciones con síntomas como el vómito, la confusión mental, el deterioro de la motricidad, la pérdida de la conciencia e incluso la muerte; en cambio los efectos crónicos, con síntomas leves, solo se toman en cuenta cuando las cifras de incidencia y prevalencia de diabetes, leucemia y otros padecimientos crónico degenerativos llaman la atención en el contexto geográfico (Mejía-Aranguré, Ortega-Álvarez y Fajardo-Gutiérrez, 2005, p. 324) y otros tipos de cáncer (González-López *et al.*, 2009, p. 593), así como la obesidad, el hipotiroidismo y otros que se han relacionado clínicamente con la exposición a plaguicidas organoclorados, fosforados, piretrinas y piretroides (Hernández-Morales, Zonana-Nacah y Zaragoza-Sandoval, 2009, p. 497; Carozza, Li, Wang, Horel y Cooper, 2009, p. 187).

Uno de los aspectos más discutibles cuando se trata de relacionar a los padecimientos crónico degenerativos con la exposición a plaguicidas es la etiología multifactorial de estas enfermedades (Daniels, Olshan, y Savitz, 1997, p. 1069); Bolognesi *et al.*, 2003, p. 256), lo cual hasta cierto punto explica, aunque no justifica, la postura omisa de las autoridades, obligadas a regular su uso (Robin, 2014, p. 129).

## REFERENCIAS

- Alarcón-Nivia, M. Á., Alarcón-Amaya, M. Á. y Blanco-Fuentes, L. (2006). Creencias, actitudes y vivencias mágicas alrededor de la menstruación entre las mujeres de Bucaramanga, Colombia. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(1), 19-27. Recuperado en <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n1/v57n1a03.pdf>
- Attarchi, M., Darkhi, H., Khodarahmian, M., Dolati, M., Kashanian, M., Ghaffari, M., ... Mohammadi S. (2013). Characteristics of menstrual cycle in shift

- workers. *Glob J Health Sci*, 5(3), 163-172. doi: <https://doi.org/10.5539/gjhs.v5n3p163>
- Beauvoir de, S. (1949). *El Segundo sexo. Los hechos y los mitos*. México: Siglo Veinte.
- Blanco, F. J. Vicente De, M. A. y Manera, J., (2000). *Análisis Multivariante para las Ciencias sociales*. Madrid: Dykinson.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251–272. doi: [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Bolognesi, C., Knasmueller, S., Nersesyan, A., Thomas, P., & Fenech, M. (2013). The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay - An update and expanded photo-gallery. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 753(2), 100-113. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2013.07.002>
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz ... & Fenech, M. (2011a). The Human MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN (XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 728(3), 88-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.06.005>
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., & Fenech, M. (2011b). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: Evidence from human studies. *Mutagenesis* 26(1), 93-100. doi: <https://doi.org/10.1093/mutage/geq075>
- Buck Louis, G. M., Rios, L. I., McLain, A., Cooney, M. A., Kostyniak, P. J. & Sundaram, R. (2011). Persistent organochlorine pollutants and menstrual cycle characteristics. *Chemosphere*, 85(11), 1742-1748. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4143889/>
- Carey, J. W. (1993). Linking qualitative and quantitative methods: Integrating cultural factors into public health. *Qualitative Health Research*, 3(3), 298-318. doi: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/104973239300300303>
- Carozza, S. E., Li, B., Wang, Q., Horel, S., & Cooper, S. (2009). Agricultural pesticides and risk of childhood cancers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 212(2), 186–195. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2008.06.002>
- Castañeda-Yslas, I. Y., Arellano-García, M. E., García-Zarate, M. A., Ruíz-Ruiz, B., Zavala-Cerna, M. G. & Torres-Bugarín, O. (2016). Biomonitoring with Micronuclei Test in Buccal Cells of Female Farmers and Children Exposed to Pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *J. Toxicol*, Article ID 7934257, 8 pp. doi: <https://dx.doi.org/10.1155/2016/7934257>
- Cho, S. I., Damokosh, A. I., Ryan, L. M., Chen, D., Hu, Y. A., Smith, T. J., et al. (2001). Effects of exposure to organic solvents on menstrual cycle length.

- J Occup Environ Med*, 43(6), 567-575. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11411330>
- Cooper, G. S., Klebanoff, M. A., Promislow, J., Brock, J. W. y Longnecker, M. P. (2005). Polychlorinated biphenyls and menstrual cycle characteristics. *Epidemiology*, 16(2), 191-200. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703533>
- Daniels, J. L., Olshan, A. F., & Savitz, D. A. (1997). Pesticides and childhood cancers. *Environmental Health Perspectives*, 105(10), 1068-1077. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1470375/>
- Farr, S. L., Cooper, G. S., Cai, J., Savitz, D. A., & Sandler, D. P. (2004). Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 160(12), 1194-1204. doi: <http://doi.org/10.1093/aje/kwi006>
- Garduño, E., Ovalle, P., y Mata, C. (2011). Caracterización socioeconómica y cultural de las mujeres indígenas migrantes en los valles de Maneadero y San Quintín, Baja California, México. *Boletín de Antropología*, 25(42), 57-83. Recuperado en <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/boletin/article/view/11225/10291>
- Garte, S., & Bonassi, S. (2005). Linking toxicology to epidemiology: Biomarkers and new technologies-Special issue overview. En *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592, 3-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.05.007>
- Ghisari, M., Long, M., Tabbo, A. & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2015). Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 284(3), 292-303. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25684042>
- Golub, S. (1976). The effect of premenstrual anxiety and depression on cognitive function. *J Pers Soc Psychol*, 34(1), 99-104. doi: <https://dx.doi.org/10.1037/0022-3514.34.1.99>
- González-Leal, A. (2011). *Ritos personales que señalan la transición de las mujeres a la segunda mitad de la vida* (Disertación doctoral). University of New Mexico. College of Education. Language, Literacy and Sociocultural Studies. Recuperada en [http://digitalrepository.unm.edu/educ\\_llss\\_etds/11](http://digitalrepository.unm.edu/educ_llss_etds/11)
- González-López, J. de J., Valles-Medina, A. M., Zonana-Nacach, A., Ortiz-Soto, I., Gómez-Torres, M. E., y Aguirre-Conde, G. (2009). Autopsia verbal de mujeres fallecidas por cáncer de mama en Baja California. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 47(6), 591-595. Recuperado en <http://www.redalyc.org/pdf/4577/457745517003.pdf>

- Gore, A. C. (2002). Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 192(1-2), 157-170. doi: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00010-2)
- Gotlib, V. I., Serebriany, A. M., Chernikova, S. B., Kudriashova, O. V. & Pelevina, I. I. (1996). [A comparison of the patterns of delayed cell death after exposure to genotoxic agents]. *Tsitologiya*, 38(9), 974-982.
- Hawkins, S. M. & Matzuj, M. M. (2008). The Menstrual Cycle. Basic Biology. *Annual N Y Academy of Science*. 1135, 10-18. doi: <https://dx.doi.org/10.1196/annals.1429.018>
- Hernández-Morales, A. L., Zonana-Nacach, A., y Zaragoza-Sandoval, V. M. (2009). Factores asociados a leucemia aguda en niños. Estudio de casos y controles. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 47(5), 497-503. Recuperado en <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=36793>
- Krol, M., Lankoff, A., Buraczewska, I., Derezińska, E. y Wojcik, A. (2007). Radiation-induced micronucleus frequencies in female peripheral blood lymphocytes collected during the first and second half of the menstrual cycle. *Radiation protection dosimetry*, 123(4), 483-489. doi: <https://doi.org/10.1093/rpd/ncl545>
- Langer, M. (1944). Algunas aportaciones a la psicología de la menstruación. *Revista de Psicoanálisis*, 2(2), 211-232.
- Lin, C. C., Huang, C. N., Hwang, Y. H., Wang, J. D., Weng, S. P., Shie, R. H., & Chen, P. C. (2012). Shortened menstrual cycles in LCD manufacturing workers. *Occupational Medicine*, 63, 45-52. doi: <https://doi.org/10.1093/occmed/kqs172>
- Maroni, M., y Bersani, M. (1994). [The role of biotransformation in assessing the toxicological risk from pesticides]. *Med Lav*, 85(1), 49-54. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8035744>
- Marván, M. L., Cortés S. y González R. (enero-junio 2014). Significado psicológico de la menstruación en madres e hijas. *Psicología y Salud*, 24(1), 89-96.
- Mason, L., Nyothach, E., Alexander, K., Odhiambo, F. O., Eleveld, A., Vulule, J., ... Phillips-Howard, P. A. (2013). "We keep it secret so no one should know" - A qualitative study to explore young schoolgirls attitudes and experiences with menstruation in rural Western Kenya. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079132>
- Mejía-Aranguré, J. M., Ortega-Álvarez, C. M., y Fajardo-Gutiérrez, A. (2005). Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Parte I *Revista Médica del IMSS*. 43(4), 323-333. Recuperado en <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2005/im054g.pdf>
- Montaño-Soto, T., Arellano-García, M.E., Camarena-Ojinaga L., Ruiz-Ruiz B. & von-Glascoe, C.A. (2014). Genotoxic biomonitoring and exposure to

- pesticides in women laborers at Maneadero valley in Baja California, Mexico. *International Journal of Applied and Natural Sciences*, 3(2), 89-96.
- Namulanda, G., Maisonet, M., Taylor, E., Flanders, W. D., Olson, D., Sjodin, A. ... & Naeher, L. (2016). In utero exposure to organochlorine pesticides and early menarche in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Environment International*, 94, 467-472. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.001>
- Ouyang, F., Perry, M. J., Venners, S. A., Chen, C., Wang, B., Yang, F. ... & Wang X. (2005). Serum DDT, age at menarche, and abnormal menstrual cycle length. *Occup Environ Med*, 62(12), 878-884. doi: <https://doi.org/10.1136/oem.2005.020248>
- Pesticides Action Network, PAN, (2016). Recuperado en <https://www.panna.org/pesticide-problem/pesticides-big-picture>
- Robin, M. M. (2014). *Our Daily Poison: from pesticides to packaging, how chemicals have contaminated the food chain and are making us sick*. New York: The New Press.
- Robles, L. (2006). Reseña de “La calidad es nuestra, la intoxicación de usted! Atribución de la responsabilidad en las intoxicaciones por plaguicidas agrícolas, Zamora, Michoacán, 1997-2000”, de J. L. Seefoó. *Salud Pública de México*, 48(5), 442-443. Recuperado en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10648511>
- Schwartz, D. & Rotter, V. (1998). p53-dependent cell cycle control: response to genotoxic stress. *Semin Cancer Biol*, 8(5), 325-336. doi: <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0095>
- Sinobas, E. P. (Coord.) (2011). *Manual de Investigación Cuantitativa para Enfermería*. Federación de Asociaciones de Enfermería Comunitaria y Atención Primaria. Cízero Digital. Recuperado de <http://www.faecap.com/publicaciones/show/manual-de-investigacion-cuantitativa-para-enfermeria>
- Strauss, B., Appelt, H., Daub, U. & Vries de, I. (1990). Generational differences in perception of menstruation and attitude to menstruation. *Psychother Psychosom Med Psychol*, 40(2), 48-56. Recuperado en <http://www.faecap.com/publicaciones/show/manual-de-investigacion-cuantitativa-para-enfermeria>
- Stubbs, M. L. (2008). Cultural perceptions and practices around menarche and adolescent menstruation in the United States. *Annals of the New York Academy of Science*. 1135, 58-66. doi: <https://doi.org/10.1196/annals.1429.008>
- Toft, G., Axmon, A., Lindh, C. H., Giwercman, A. & Bonde, J. P. (2008). Menstrual cycle characteristics in European and Inuit women exposed to persistent organochlorine pollutants. *Human Reproduction*, 23(1), 193-200. doi: <https://doi.org/10.1093/humrep/dem349>
- Toft, G., Thulstrup A. T. Jönsson B. A., Pedersen H.S., Ludwicki J. K., Zvezday V. & Bonde J. P. (2010). Fetal loss and maternal serum levels of

2,2',4,4',5,5'-hexachlorbiphenyl (CB-153) and 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE) exposure: a cohort study in Greenland and two European populations. *Environmental Health*, 9(22):1-11. doi: <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-22>

Yazbek, P. B., Tezoto, J., Cassas, F. y Rodrigues, E. (2016). Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. *J Ethnopharmacol*, 179, 310-331. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.054>

Zúñiga-Violante, E., Arellano-García M.E., Camarena-Ojinaga, L., Daesslé-Heusser, W, Von-Glascoe, C. A., Leyva-Aguilera J. C. y Ruiz Ruiz, B. (2012). Daño genético y exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas del Valle de San Quintín, Baja California, México. *Revista de Salud Ambiental*, 12(2), 93-101.

---

## CAPÍTULO 7

### CONTINUIDADES Y DISRUPCIONES EN LA SALUD SEXUAL Y REPRODUCTIVA DE MUJERES INDÍGENAS EN EL VALLE DE SAN QUINTÍN

*Lourdes Camarena Ojinaga, Concepción Martínez Valdés, Christine Von Glascoe y María Evarista Arellano García*

#### INTRODUCCIÓN

En este trabajo se presentan resultados de un estudio realizado en el valle de San Quintín, Baja California, una región que a lo largo de cuarenta años ha tenido un desarrollo agrícola importante mediante la producción de hortalizas y frutas de exportación convirtiéndose en un polo de atracción para trabajadoras migrantes, en su mayoría indígenas provenientes del estado de Oaxaca: triquis, zapotecas y especialmente mixtecas.

El capítulo aborda desde un punto de vista sociocultural los cambios y continuidades en los saberes y prácticas relacionados con la sexualidad y la salud reproductiva de mujeres indígenas migrantes que radican en el valle de San Quintín. La información proviene de las percepciones de las informantes.

La sexualidad y la reproducción en la población indígena, y sus conocimientos al respecto, presentan una serie de características



que la distinguen de los grupos poblacionales no indígenas. Considerando que los grupos indígenas viven en mayor pobreza y cuentan con reducida escolaridad, las mujeres en particular, además de la exclusión en la que viven, también enfrentan un sistema monocultural de salud, específicamente respecto a la salud sexual y reproductiva, lo cual se pone de manifiesto en la apatía e indiferencia de las y los profesionales de la medicina para reconocer los saberes que poseen las mujeres en torno a su propia salud.

Esto las coloca en posición de desventaja y vulnerabilidad frente al resto de la sociedad, lo cual impacta las condiciones en que experimentan los procesos de salud sexual y reproductiva (Romeo, 2011). Además, las mujeres indígenas están sujetas a una triple discriminación: por su condición étnica, por la socioeconómica, y también por su posición subordinada ante los hombres de sus comunidades, lo que les dificulta tomar decisiones con respecto a su propia salud reproductiva.

Desde el Estado se plantea que la responsabilidad sobre el cuerpo y la sexualidad es una cuestión individual. Al respecto, Langer y Tolbert (1998) señalan que, tanto la comunidad como cada persona, tendrían que contar con la información necesaria para garantizar su libertad de elección, otorgando el debido reconocimiento a sus prácticas culturales diferenciadas y contando con el acceso a los servicios de salud y educación que salvaguarden la integralidad cultural. Los pueblos indígenas enfrentan problemas asociados con información poco accesible para ellos ya que generalmente está dirigida a población no indígena (Soberanes, 2002; Tinoco, 2009). Esta situación refleja la ausencia de un ejercicio pleno de los derechos sexuales y reproductivos de este grupo poblacional.

En general, México tiene un sistema monocultural de salud que detenta el poder en el ejercicio de la medicina occidental, particularmente con respecto a la salud sexual y reproductiva, se manifiesta en la indiferencia de las y los profesionales de la medicina para reconocer los saberes de las mujeres indígenas en torno al embarazo, parto y posparto. En la actualidad los formularios y documentos

de clínicas y hospitales están escritos en un español técnico; si bien es cierto que gran parte de la población indígena es bilingüe, este hecho le dificulta la plena comprensión de preguntas e información, por ello, una de sus demandas es contar con intérpretes en los servicios de salud.

La salud sexual y reproductiva es un importante tópico en el campo de la salud. Se reconoce que la sexualidad es un fenómeno complejo y multidimensional en el cual interactúan factores fisiológicos, emocionales y socioculturales (Azar, Kroll y Bradbury, 2016). Siguiendo esta postura, Salles y Tuirán (2001) señalan que “la sexualidad y la reproducción humana están inmersas en estructuras y redes de relaciones sociales (...) Los comportamientos reproductivos, los sexuales y los de cuidado de la salud pueden ser entendidos como conductas socialmente estructuradas dotadas de significado” (p. 99). La salud sexual y reproductiva implica valores, normas, conocimientos y prácticas que dependen del contexto geográfico, la cosmovisión y la construcción de relaciones entre mujeres y hombres, así como del *rol* que le corresponde a cada persona de acuerdo con su grupo de edad. Los obstáculos para que las mujeres indígenas ejerzan de manera cotidiana los derechos sexuales y reproductivos, se ven articulados por un eje transversal de desigualdad social y de género. Según Figueroa (1999), el ejercicio de los derechos reproductivos será factible cuando los contextos social, político, legal, económico y cultural favorezcan el acceso a estas posibilidades y además, cuando los personajes institucionales logren comprender el proceso reproductivo con el que se relacionan y la propia institución respete las condiciones y tiempos propicios para su interacción

La incorporación al trabajo agrícola de las mujeres indígenas migrantes ha significado su inserción en mercados laborales segmentados y especializados, caracterizados por la feminización del trabajo, empleo precario, salarios bajos y condiciones de vida inestables y también precarias (Lara, 2001, 2008; Velasco, 2007, 2008, 2014). El estar trabajando y contribuyendo al ingreso familiar y, en

algunos casos, el verse convertidas en principales proveedoras del hogar, no las exime de sus responsabilidades domésticas ni hacia sus hijas e hijos, lo cual se traduce, por un lado, en la triple jornada a la que se ven sujetas (Ariza, 2007; Lara, 2003) y, por otro, en una mayor monetización y feminización del cuidado de ellos, al tener que pagarle a otra mujer para que lo haga (Arias, 2013).

La confluencia de la experiencia laboral y la experiencia migratoria de estas mujeres conlleva el desarrollo de nuevas dinámicas entre ellas, sus parejas y su progenie, las cuales se manifiestan en relaciones genéricas e intergeneracionales cambiantes, a la vez que resignifican sus normas y valores sociales. Si bien estas experiencias les proporcionan mayor independencia, autonomía y cierto grado de empoderamiento, como lo señalan varios estudios (Suárez y Zapata, 2004; Ariza, 2007), en el ámbito de la sexualidad y la reproducción, observamos que este sigue siendo un terreno contestatario.

Los cambios intergeneracionales con relación a la salud sexual y reproductiva se han estudiado, con diversas temáticas y metodologías, a partir de la transición demográfica en los países desarrollados. Han sido de particular interés la fertilidad y la fecundidad, la edad de iniciación de las relaciones sexuales, las nociones acerca de la fidelidad y afectividad, el número de parejas, así como la transmisión de conocimientos, actitudes y valores de las personas adultas a las jóvenes, entre otros temas (Jennings, Sullivan y Hacker, 2012; Bonell, 2004). Varios estudios sobre poblaciones de países en vías de desarrollo (Dean, Mitchell, Stewart y Debattista, 2016; Zhou, 2012; Rajapaksa-Hewageegana, Piercy, Salway y Samarage, 2015; Waxman, Humphries, Frohlich, Dlamini, y Fanelessibonge, 2016) señalan la interrelación entre normas y prácticas de género y la construcción de nuevas prácticas y actitudes en las generaciones jóvenes, al respecto, Margulis (2003) refiere que “las generaciones más jóvenes, que se socializan en un mundo que ya trae consigo los nuevos valores y los cambios culturales, viven con naturalidad la supresión de arraigadas prohibiciones y la

emergencia de nuevas modalidades en órdenes tan sensibles como la familia, la sexualidad y las relaciones hombre-mujer” (p. 138).

Un estudio sobre el cambio de percepciones de género y sexualidad en mujeres indígenas de Oaxaca, señala que a pesar de las transformaciones en los conocimientos relacionados con la sexualidad, entre las mujeres jóvenes, las normas culturales continúan jugando un papel importante (Karver, Sorhaindo, Wilson y Contreras, 2016). Específicamente, reporta que las normas culturales de género todavía les dictan cómo expresar y vivir su sexualidad. Particularmente indica que los sentimientos de vergüenza y temor condicionan la expresión de su sexualidad, y que aún consideran que la virginidad determina el valor de una mujer. Además, señala que la maternidad sigue siendo un referente clave de la feminidad. El estudio considera que son necesarios programas de educación sexual culturalmente apropiados y, centrados en la autonomía de las mujeres.

En su conjunto, las rupturas estructurales como la migración, la precarización laboral, los cambios en torno a derechos y salud sexual y reproductiva dan cuenta de los quiebres de patrones socioeconómicos y culturales, así como de la manera que afectan la vida de las mujeres estudiadas. Desde esta perspectiva, poner el acento en las continuidades y rupturas que caracterizan sus experiencias laborales y migratorias permite preguntarse sobre las dimensiones simbólicas y subjetivas para establecer el vínculo entre la experiencia individual y la social en cuanto al cambio de sus percepciones sobre la salud sexual y reproductiva.

El hilo conductor del trabajo que aquí se presenta, parte de una pregunta central ¿las percepciones de la salud sexual y reproductiva son construidas desde el andamiaje cultural de las comunidades de origen de las mujeres de este estudio o por el contrario, son resignificadas en la sociedad que las acoge? Méndez (2007) señala que algunas teorías del proceso de migración en el siglo XX se enfocan en el estudio de la manera en que inmigrantes recientes cambian su comportamiento una vez que arriban al lugar de destino. Comenta

que la perspectiva convencional considera que quienes inmigran modifican su comportamiento social y económico para adaptarse a la cultura dominante de la sociedad receptora.

Otra perspectiva es la que señala Moebus (2008) basándose en la propuesta de García Canclini, la cual plantea el análisis de los procesos de entrecruzamiento e intercambio culturales, por medio del mecanismo de la hibridación, caracterizado como los “procesos socioculturales en los que [algunas] estructuras o prácticas discretas, que existían de forma separada, se combinan para generar nuevas estructuras, objetos y prácticas” (p. 38). Moebus afirma que esta noción está basada en el principio de la interculturalidad, la cual rechaza la simplificación binaria entre pares de oposición conceptual como modelo de explicación de la realidad.

La postura de las autoras de este texto es que las percepciones de las mujeres indígenas que migran del sur del país al valle de San Quintín experimentan una forma de hibridación donde combinan patrones cognitivos y comportamentales de su lugar de origen con las pautas culturales de la región a la que emigran. Son actoras sociales que van reconstruyendo y resignificando sus prácticas culturales en el sitio de destino.

## ASPECTOS METODOLÓGICOS

Se trabajó la investigación con un diseño cualitativo. Participaron en total 60 mujeres indígenas migrantes de primera generación y migrantes de segunda generación, de cuatro diferentes localidades; reclutadas mediante la técnica de bola de nieve. La mayoría de las mujeres mayores trabajan como jornaleras y las mujeres jóvenes, además de estudiar, laboran temporalmente en el campo.

Los criterios de inclusión fueron: ser indígena, hablar español, tener como mínimo año de residencia en la localidad y contar con su consentimiento, previa lectura de una carta en la cual se enunciaban los fines del estudio, la confidencialidad de la información

y se pedía autorización para su participación. El intervalo de edad comprendió entre los 17 y 60 años, con el objetivo de obtener una variedad de puntos de vista y explorar las experiencias intergeneracionales sobre su salud sexual y reproductiva.

Las características sociodemográficas de la población estudiada fueron las siguientes:

Edad. La edad promedio fue de 36 años; 17% tiene menos de 20 años, mientras que 51% tiene entre 20 y 44 años y 32% es mayor de 45 años.

Escolaridad. 15.6% no cuenta con algún grado de estudios y 40.6% asistió a algún grado de primaria; 15.6% posee algunos grados de secundaria, 14.1% de educación media superior, 1.6% tiene licenciatura y para 12.5% no hay datos.

Lengua. Todas hablan español, además, 35.9% habla mixteco, 7.8% triqui, 3.1% zapoteco 1.6% purépecha, 39.1% no habla una lengua indígena y de 12.5% no hay información.

Las mujeres que integraron los grupos de cada localidad participaron en dos talleres con una duración de ocho horas cada uno. En ambos se utilizaron técnicas de educación popular. El primer taller obtuvo información sobre cómo perciben su cuerpo, las etapas del desarrollo de la mujer, los métodos anticonceptivos y cuidados en el embarazo, así como de las enfermedades de la mujer que ellas consideran más comunes. El segundo taller se enfocó en explorar qué es lo que conocen sobre el derecho a la salud, el acceso a los servicios de salud, la interacción personal médico-paciente, los derechos de las pacientes, así como sus saberes en torno a la salud sexual y la salud reproductiva.

El equipo de investigación estuvo consciente de que trabajar con estas temáticas pudo haber causado ciertas reservas para compartir de manera más explícita sus experiencias y opiniones durante los talleres. Cabe resaltar que en las retroalimentaciones al final de cada taller, las mujeres comentaron que fue la primera vez que hablaron de estos temas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que actualmente en México hay mayor acceso a educación sexual y a información sobre planificación familiar, debido no solamente a las transformaciones socioeconómicas generadas por los procesos de globalización, sino también como resultado de las acciones impulsadas por el movimiento feminista, la sexualidad sigue siendo un ámbito donde persisten desigualdades y estereotipos de género. Las políticas públicas mexicanas sobre la salud sexual y reproductiva se han modificado paulatinamente en pro de las mujeres; sin embargo, como menciona García (2015), estos cambios se han producido más en el discurso que en acciones ya que “en el día a día, las mujeres siguen siendo el objeto principal de control, tanto en la implementación institucional como en todas las relaciones sociales sustentadas en el imaginario social de la domesticidad” (p. 99).

Se encontró que el contexto de vida de estas mujeres indígenas ha influido en su percepción no solamente de su salud sexual y reproductiva sino del ser mujer y su propia sexualidad. La experiencia migratoria y la inserción en el mercado laboral de las mujeres mayores ha contribuido a cambios en su autopercepción, mientras que en las jóvenes, se refleja una actitud más abierta en torno a la sexualidad como consecuencia de haber crecido en un contexto más urbano, tener cierto acceso a educación sexual en la escuela, estar más expuestas a los medios de comunicación y al uso de redes sociales.

### **Experiencias y saberes sobre los cambios en el ciclo de vida**

La familia, en términos generales, no constituye una fuente de información o formación sexual para el grupo de mujeres mayores, quienes reportaron no haber recibido orientación sobre la menarquia por parte de sus familiares ni de la escuela; la mayoría recuerda que esa experiencia le produjo miedo y angustia. Ellas no sabían qué les estaba pasando y tenían temor de ser castigadas por

sus madres, ya que en sus lugares de origen se acostumbraba que aun siendo niñas eran entregadas a su pareja y el primer sangrado ocurría en su primera relación sexual, de ahí que sus madres interpretaran que la menarquia de sus hijas era consecuencia del contacto sexual, al grado que una de las mujeres fue corrida de su casa cuando sangró sin haber sido entregada a una pareja. Algunas reportaron que, a pesar de que este evento fue traumático para ellas, tampoco orientaron a sus hijas, pues culturalmente se cree que la mujer no debe saber, y por consiguiente, tampoco preguntar.

Por su parte, las mujeres jóvenes del estudio comentaron que la poca información recibida fue a través de amigas de la escuela y hermanas mayores. En ambos casos fue notorio que tanto las mujeres mayores como las más jóvenes no recibieron orientación de sus madres sobre estos temas. Sin embargo, las más jóvenes reconocieron la importancia de platicar con sus hijas sobre la sexualidad, aunque admitieron que no se han atrevido ya que no saben cómo acercarse y abordar el tema con ellas.

### **Planificación familiar y embarazo**

La mayoría de las mujeres conoce métodos de anticoncepción recomendados por el sector salud, tales como el uso de condón, la ingesta de pastillas, aplicación de inyecciones, inserción del DIU (dispositivo intrauterino), la implantación de parches, la píldora del día después. En términos de la anticoncepción, la mayoría de las mujeres mayores que tienen pareja refirieron que son ellas quienes toman la iniciativa para el uso de algún método, con excepción del condón cuyo uso es mínimo. El motivo principal para tomar la decisión de emplear algún método anticonceptivo, suele ser la precaria situación económica, según mencionaron las mujeres; aunque también podría interpretarse como resultado de los cambios propiciados por la migración y el ingreso de la mujer al mercado laboral, lo cual, quizás conduce a modificaciones en su percepción sobre la maternidad.



Por otra parte, las mujeres jóvenes sin pareja estable tienen conocimiento de los diferentes métodos, pero no los usan, porque no se atreven a solicitarlos, ya sea por pudor o por presión social.

### **Ser mujer y sexualidad**

Al referirse a la sexualidad en la familia, las mujeres más jóvenes comentaron que es importante hablar con la pareja de cómo planificar cuántos hijos tener. Señalaron que deben enfrentar juntos los problemas de salud en la familia y debe haber mucha comunicación con las y los hijos; consideraron importante hablarles de los riesgos de enfermedades de transmisión sexual; el padre debe platicar con sus hijos varones sobre las consecuencias de la sexualidad y la madre con sus hijas.

Hablar sobre la sexualidad con sus hijas(os) es importante para las mujeres jóvenes, ya que tanto ellas como sus propias madres tuvieron la experiencia de la falta de comunicación. Así lo expresa esta mujer de 27 años:

Pues fue triste para mi mamá que haya pasado eso, también su mamá igual no le explicaba; cuando ella llegó a cierta edad, entonces ella ya preguntó, me imagino que mi abuelita también era de esas ideas de no comentarlo. Y pues ahorita ya no, como yo tengo a mi hijo, pues platico con él cómo se llaman sus partes porque él también me preguntó, él me dice ¿de dónde vienen los bebés? Ay pues es muy difícil esa pregunta...yo también quisiera que alguien me dijera cómo hacerle para decirle a mi hijo [...] me cuesta más con el niño, pero siento que sí le tengo que hablar [...] Le digo [a mi esposo] que él debe de decirle porque él es también, o cosas así de los hombres que le tiene que platicar.

Respecto a las decisiones en pareja, afirmaron que para tomarlas se requiere comunicación, hablar sobre sus dudas y practicarse revisiones para prevenir infecciones y enfermedades de transmisión

sexual. Enfatizaron estar de acuerdo con la planificación familiar y el sexo con responsabilidad.

En torno a su propia sexualidad, las mujeres más jóvenes manifestaron que pueden decidir sentir placer y tener relaciones por su propia voluntad. Señalaron que respetar su cuerpo es respetarse, quererse a sí mismas y que tienen derecho a que las otras personas respeten su cuerpo y sus emociones. Además expresaron la necesidad de ser informadas sobre el uso de anticonceptivos, la sexualidad, cómo cuidarse para evitar enfermedades de transmisión sexual y también acerca de practicarse exámenes de detección oportuna de cáncer. Con relación a la vida sexual, a diferencia de las mujeres mayores, comentaron que para ellas es importante que su pareja respete su decisión de tener o no hijos y decidir cuántos.

Algunas de las mujeres jóvenes de segunda generación viven un proceso de reconstrucción de lo que significa ser mujer y de los roles de género, como se ilustra en la siguiente cita:

Ser mujer así como biológicamente, pues no me parece pues muy interesante, este, no lo sé, cómo que no pienso así, como que ser mujer es lo peor que me ha pasado o agradecer eternamente ser mujer, porque pues realmente yo estoy bien con lo que soy. Lo digo así porque también he conocido a personas que no les gusta el sexo con el que nacieron, aunque para mí eso no es un problema, yo siento que podría vivir independientemente del aparato reproductor que tenga. Entonces como persona no es un problema para mí verme al espejo, pero sí ya sobre los *roles* de género, entonces sí es un poco más difícil porque yo no creo guiarme por ninguno en especial, pero si es un poco difícil que los demás entiendan tu forma de pensar. Mis compañeros inmediatamente lo interpretan de una forma: soy lesbiana, y mis compañeras lo interpretan que soy una ofrecida porque me gusta estar con puros muchachos. Entonces lo complicado es el *rol* de género, que automáticamente haces algo porque eres mujer o porque no quieres ser mujer.

Para las mujeres indígenas que participaron en este estudio, hablar sobre su sexualidad es difícil porque se les puede juzgar como

mujeres poco respetables, ya que se considera una falta de respeto hablar de sexo y de deseo. La sexualidad tiene un significado dual, positivo en cuanto se refiere a la maternidad y negativo cuando se relaciona con lo erótico. Estas percepciones, para algunas mujeres, se modifican al salir de sus lugares de origen y asentarse en el lugar de acogida. Al interactuar con otras mujeres van cambiando sus apreciaciones sobre estos aspectos, ya no suelen percibirse como cuidadoras de las(os) otros y colocarse en último lugar en la familia, sino que ahora se reconocen como seres sexuados y, por lo tanto, empiezan a apropiarse de su cuerpo y de sí mismas.

Las mujeres jóvenes se ven a sí mismas en términos de sus expectativas y metas futuras, tener una educación es parte de su proyecto de vida, una visión que implica más allá de trabajar en el campo como sus propias madres. Como lo señaló una de ellas:

Me imaginé [...] que tenía novio, pero sin hijos ni nada y que seguía estudiando [...] un novio que me tomara en cuenta y que pues tenga sus responsabilidades, que siga estudiando al igual que yo, seguir estudiando para que, -pues mi mamá dice que el campo es muy pesado, el salario es bajo- y que me trate con respeto.

Otra mujer joven casada y con un hijo expresó su deseo de estudiar:

Lo que a mí me gustaría [estudiar], pues creo trabajo social, que está en Ensenada y pues no cuento con el recurso de poder estudiar, pero si me gusta mucho [...] Sí, pues en eso ando ahorita, hay un contrato, ahorita sale un contrato aquí en la Guerrero, de personas que contratan para ir al otro lado y yo platico con mi mamá y mi esposo, que este ya metí papeles y quiero trabajar, ahorrar e ir a la escuela.

## **Interacción y experiencias con los servicios de salud**

Una gran parte de las mujeres acude a instituciones públicas del sector salud, aunque también recurre a la medicina tradicional para

atender ciertos padecimientos. Un aspecto que interviene persistentemente en la salud de la mujer es el tipo de contacto que se establece entre ella y quien presta el servicio de salud, la relación médico-paciente. Entre ambos se instaura indudablemente una dinámica de poder y dependencia que se agudiza cuando uno es hombre y la otra mujer.

Como refieren Campero, Días, Ortiz, García, Reinoso y Langer (2000), la información que la mujer recibe del personal médico y de la enfermera es, en general, muy poca, además de caracterizarse por ser autoritaria y unidireccional, como es el caso de las mujeres de este estudio. La atención brindada a las mujeres en los servicios institucionales, no sólo es deficitaria, sino que se otorga con una visión institucional unilateral que deja de lado la expresión y voz de las mujeres que la reciben. La práctica social y cultural del personal médico está marcada por el ejercicio de poder hacia las mujeres que acuden a los servicios de salud, se expresa en su saber vertical, dando poca importancia a las demandas, necesidades y saberes populares no especializados de las mujeres. Esta situación provoca un desencuentro que inhibe el intercambio de información y fomenta el trato autoritario de todas(os) los agentes de salud hacia las mujeres. Sin embargo, cada vez con mayor frecuencia las mujeres indígenas expresan sus necesidades ante los servicios de salud y demandan su solución, por ejemplo, solicitan ser atendidas por mujeres médicas, sobre todo con la especialidad en ginecología y obstetricia y demandan la presencia de intérpretes en los consultorios y hospitales.

La interacción personal médico-pacientes ocurre de dos maneras: una en la que las y los médicos son atentos, responsables y respetuosos; y otra en la que existe discriminación y maltrato hacia las mujeres por su condición indígena, lo cual refleja que esta relación es desigual. Además, dado el poco tiempo que se dispone para la consulta, difícilmente quienes prestan los servicios conceden importancia a los aspectos emocionales de las usuarias. Así, persiste el trato poco respetuoso para las mujeres indígenas, no se

les garantiza privacidad y confidencialidad, y no siempre reciben información completa acerca de los servicios disponibles.

En los centros de salud es frecuente la falta o insuficiencia de medicamentos, no hay especialistas ni traductores y cuentan con poco equipo médico. Con respecto a los servicios del Instituto Mexicano del Seguro Social, las mujeres que están o estuvieron en algún momento afiliadas, reconocen que está mejor equipado y existe menos rotación de personal médico. Sin embargo, hay mucha burocracia para realizar trámites y a veces el trato por parte del personal no es el adecuado. Algunas de las mujeres indígenas que acuden a los centros de salud son monolingües o tienen insuficiente conocimiento del español, por lo que se les dificulta comprender las indicaciones que el personal de salud les brinda. La Comisión Nacional de los Derechos Humanos ha observado que algunas de las quejas presentadas por mujeres indígenas manifiestan que las y los servidores públicos de las clínicas rurales de las instituciones de salud pública, tanto estatales como federales, imponen en cierta medida los métodos de planificación familiar sin su consentimiento y sin otorgarles información amplia y adecuada en su propio idioma (Soberanes, 2002).

## CONCLUSIONES

La condición de ser mujer ha sufrido cambios que se pueden explicar por la experiencia migratoria de lo rural a lo urbano, la interacción con otras mujeres, así como por las relaciones intergeneracionales. Los procesos migratorios las exponen a un ambiente de vida distinto que da nueva forma a sus prácticas y saberes sobre su salud sexual y reproductiva. Las mujeres indígenas de este estudio han reconstruido su identidad en la interacción constante con otras mujeres indígenas y no indígenas en esta región, en la vida cotidiana, en los vínculos comunitarios, en los nuevos trabajos donde han transformado y resignificado sus creencias y percepciones a

partir de su experiencia migratoria. Los cambios en sus condiciones de vida se expresan en la percepción de su sexualidad y también en la forma de concebir su identidad étnica y de género como sujetos de derechos.

Estas transformaciones ocurren generalmente en mujeres adultas jóvenes, no así en las mujeres adultas mayores en quienes las normas culturales están más fuertemente interiorizadas. Las mujeres mayores que migraron solas o con sus familias a la zona de San Quintín, siguiendo la ruta de las oportunidades laborales, aún estaban sujetas a las costumbres de sus lugares de origen, especialmente en lo que respecta a temas de sexualidad y reproducción; para ellas la sexualidad femenina tiende a restringirse a la maternidad y sigue siendo un tabú que prohíbe o limita las expresiones abiertas de la sexualidad, recurriendo al silencio como mecanismo cultural.

Se ha advertido que los cambios en la percepción de estos temas entre las generaciones, abuela-madre-hija, influyen en el comportamiento de las mujeres, aunque en algunas de las mayores persisten los estereotipos de género. Los procesos de diálogo intergeneracional sobre sexualidad son prácticamente inexistentes a nivel comunitario, es usual que las madres no hablen de esos temas con las hijas.

Se ha discutido que el sistema de salud en México es monocultural, particularmente con respecto a la salud sexual y reproductiva. Desde el Estado el intento de llegar a la población indígena es mediante adecuaciones interculturales a los programas de salud, sin embargo, el problema es estructural, y por lo tanto, requiere de un cambio de visión de la salud y no solamente de implantar programas adicionales dentro del paradigma vigente. Es por ello que en el ejercicio de la medicina existe una relación asimétrica de poder y también discriminatoria de quienes prestan los servicios de salud a la población indígena. En relación a la salud sexual y reproductiva se articulan tradiciones y modernidades que responden a lógicas diferentes que dificultan entablar un diálogo entre las instituciones y las poblaciones indígenas, por lo cual no solo es necesario mejorar los procesos de comunicación con las personas usuarias,

sino incorporar el conocimiento cultural y social de este sector de la población.

La salud sexual y reproductiva debe ser pensada como un tejido de varios factores entrelazados donde se pueda incorporar también la subjetividad de las propias mujeres, cómo viven su sexualidad en su vida cotidiana, en la relación con sus parejas y en su interacción con otras mujeres.

## REFERENCIAS

- Arias, P. (2013). International Migration and Familial Change in Communities of Origin: Transformation and Resistance. *Annual Review of Sociology*, 39, 429-450. Recuperado el 13 de abril de 2016 en <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-soc-122012-112720> doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-soc-122012-112720>
- Ariza, M. (2007). Itinerario de los estudios de género y migración en México. En M. Ariza, y A. Portes (coord.). *El país transnacional: migración mexicana y cambio social a través de la frontera* (p. 453-511). México: UNAM-Porrúa.
- Azar, M., Kroll, T., & Bradbury-Jones, C. (junio 2016). Lebanese women and sexuality: A qualitative inquiry. *Sexual & Reproductive HealthCare*, 8:13-18. Recuperado el 5 de abril de 2016 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27179372>
- Bonell, C. (2004). Why is teenage pregnancy conceptualized as a social problem? A review of quantitative research from the USA and UK. *Culture, Health & Sexuality*, 6(3), 255-272. Recuperado el 9 de mayo de 2016 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21972877>
- Campero, L., Días C., Ortiz O., García C., Reinoso S. y Langer A. (2000). Apoyo psicosocial durante el parto: experiencias y percepciones de las madres, doulas y el personal clínico del hospital. En C. Stern y C. Echarri (comp.). *Salud reproductiva y sociedad. Resultados de investigación*. México: Colmex.
- Dean, J., Mitchell, M., Stewart, D., & Debattista, J. (2016). Intergenerational variation in sexual health attitudes and beliefs among Sudanese refugee communities in Australia. *Culture, Health & Sexuality*, 18, 1-15. Recuperado el 7 de junio de 2016 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268405>
- Figueroa, J. (1999). Derechos reproductivos y el espacio de las instituciones de salud: algunos apuntes sobre la experiencia mexicana en A. Ortiz-Ortega

- (comp.) *Derechos reproductivos de las mujeres: un debate sobre justicia social en México*, México: EDAMEX, pp. 147-190.
- García, M. I. (2015). El control del crecimiento de la población y las mujeres en México: organismos internacionales, sociedad civil y políticas públicas. *Revista Colombiana de Sociología*, 38(2), 93-111.
- Jennings, J. A., Sullivan, A. R., & Hacker, J. D. (2012). Intergenerational Transmission of Reproductive Behavior during the Demographic Transition. *Journal of Interdisciplinary History*, 42(4), 543-569. Recuperado el 17 de febrero de 2016 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22530253>
- Karver, T., Sorhaindo, A., Wilson, K., & Contreras, X. (2016). Exploring intergenerational changes in perceptions of gender roles and sexuality among indigenous women in Oaxaca. *Culture, Health & Sexuality*, 18(8), 845-859. Recuperado 24 de marzo de 2017 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26928352>
- Langer, A. y Tolbert, K. (1998). *Mujer: sexualidad y salud reproductiva en México*. México: The Population Council, EDAMEX.
- Lara, S. (2001) Análisis del mercado laboral en México en un contexto de flexibilización. En N. Giarraca (comp.) *Una nueva ruralidad en América Latina*. Buenos Aires: CLACSO.
- Lara, S. (2003). Violencia y contrapoder: una ventana al mundo de las mujeres indígenas migrantes, en México. *Revista Estudios Feministas* 11(2), 381-397. Recuperado el 12 de septiembre de 2016 en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=38111203>
- Lara, S. (2008). ¿Es posible hablar de un trabajo decente en la agricultura moderna-empresarial en México? *El Cotidiano*, 23(147), 25-33. Recuperado el 12 de septiembre de 2016 en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32514704>
- Margulis, M. (2003). *Juventud, cultura, sexualidad: la dimensión cultural en la afectividad y la sexualidad de los jóvenes de Buenos Aires*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Biblos.
- Méndez, A. (2007). ¿Emigrar para volver?: de la asimilación al transnacionalismo. Problemas del Desarrollo. *Revista Latinoamericana de Economía*, 38(148), 99-126. Recuperado el 11 de septiembre de 2016 en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=11820155005>
- Moebus, A. (2008). Hibridismo cultural: ¿clave analítica para la comprensión de la modernización latinoamericana? La perspectiva de Néstor García Canclini. *Sociológica*, 23(67), 33-49. Recuperado el 18 de julio de 2016 en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-01732008000200003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-01732008000200003)
- Rajapaksa-Hewageegana, N., Piercy, H., Salway, S. & Samarage, S. (2015). Sexual and reproductive knowledge, attitudes and behaviours in a school going population of Sri Lankan adolescents. *Sexual & Reproductive HealthCare*, 6, 3-8.



- Recuperado el 20 de julio de 2016 en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877575614000391> doi: <https://doi.org/10.1016/j.srhc.2014.08.001>
- Salles, V. y Tuirán, R. (2001). Sexualidad y salud reproductiva. Avances y retos para la investigación. En C. Stern y G. Figueroa (eds.) *Sexualidad y salud reproductiva. Avances y retos para la investigación* (93-113). México: Colmex.
- Soberanes, J. (2002). Recomendación General Número 4. *Derivada de las prácticas administrativas que constituyen violaciones a los derechos humanos de los miembros de las comunidades indígenas respecto de la obtención de consentimiento libre e informado para la adopción de métodos de planificación familiar*. Comisión Nacional de los Derechos Humanos. Recuperado el 15 de junio de 2016 en [www.cndh.org.mx/sites/all/doc/Recomendaciones/generales/RecGral\\_004.pdf](http://www.cndh.org.mx/sites/all/doc/Recomendaciones/generales/RecGral_004.pdf)
- Suárez, B. y Zapata, E. (2004) Ellos se van, ellas se quedan: enfoques teóricos de la migración. En B. Suárez y E. Zapata (coords.) *Remesas, milagros y mucho más realizan las mujeres indígenas y campesinas* (15-69). México: Grupo Interdisciplinario sobre Mujer, Trabajo y Pobreza (Gimtrap).
- Tinoco, R. (2009). Sexualidad y salud reproductiva en los programas de educación y comunicación con pueblos indígenas. En, P. Vargas, *Programa Nacional de Población 2008-2012: Debates y propuestas*. Consejo Nacional de Población Press. Recuperado el 18 de junio de 2016 en [http://www.cisc.org.mx/pdf/2010/Sexualidad\\_y\\_salud\\_reproductiva\\_en\\_los\\_programas\\_de\\_educacion.pdf](http://www.cisc.org.mx/pdf/2010/Sexualidad_y_salud_reproductiva_en_los_programas_de_educacion.pdf). Consultado en Junio 2016.
- Velasco, L. (2000). Imágenes de violencia desde la frontera México-Estados Unidos: Migración indígena y trabajo agrícola. *El Cotidiano*, 16(101), 92-102. Recuperado en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=32510109>
- Velasco, L. (2007). Diferenciación étnica en el valle de San Quintín: cambios recientes en el proceso de asentamiento y trabajo agrícola. (Un primer acercamiento a los resultados de investigación). En M. Ortega, P. Castañeda y J. Sariego, *Los jornaleros agrícolas, invisibles productores de riqueza*. México: Plaza y Valdés.
- Velasco, L., Zolniski, C y Coubes, M. L. (2014). *De Jornaleros a Colonos: Residencia, trabajo e identidad en el valle de San Quintín*. México: COLEF.
- Waxman, A., Humphries, H., Frohlich, J., Dlamini, S. & Fanelessibonge, N. (2016). Young women's life experiences and perceptions of sexual and reproductive health in rural KwaZulu-Natal South Africa. *Culture, Health & Sexuality*, 18, 1-15. Recuperado el 7 de marzo de 2017 en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27216483>
- Zhou, Y. (2012). Changing behaviours and continuing silence, sex in the post-immigration lives of mainland Chinese immigrants in Canada. *Culture, Health & Sexuality*, 14(1), 87-100. Recuperado el 30 de septiembre de 2017 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22084889>

---

## 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 (NOx) 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 desnaturalización 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 (Santamaria, 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 ( $N-NO_3^-$ ) es reducido a nitrito ( $NO_2^-$ ) 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 pylori*. 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, prematuridad 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 sulfottransferasas (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).

## 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  $O_2$  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



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.

## ESTUDIOS QUE ASOCIAN EL N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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

presencia de cuerpos de Heinz en el interior de los eritrocitos y, por tanto, el hallazgo de precipitados de Hb, se encuentra asociado a defectos congénitos que conllevan una alteración en el enlace hemoglobina; este trastorno en el enlace presenta una inestabilidad de la hemoglobina que conduce a su desnaturalización. (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food, 2017).

Hay muy pocos estudios de este contaminante y sus efectos en la reproducción. Uno de ellos fue realizado en la isla de Prince Edward (Bukowski, Somers y Bryanton, 2001), donde se relacionó la actividad agrícola con el peligro para la calidad del agua subterránea, única fuente del agua potable en la isla. Este estudio investigó el impacto de la exposición al nitrato del agua subterránea sobre el crecimiento intrauterino del producto. De una base de datos de 4098 nacimientos en la isla Prince Edward se registraron 210 casos con disminución en el crecimiento intrauterino y 336 nacimientos prematuros. Las categorías más altas de la exposición a nitrato fueron asociadas positivamente a la disminución del crecimiento intrauterino (OR=2.37; 95% IC, 1.07–4.80) y (OR=2.56; 95% IC, 1.44–5.62).

Este capítulo presenta resultados de una investigación cuyo objetivo fue asociar el consumo de agua contaminada con nitratos y sus efectos adversos en la reproducción femenina. Se diseñó un estudio transversal realizado en diez comunidades ganaderas y agrícolas donde el universo de trabajo estuvo conformado por 2,325 mujeres que se encontraban en etapa reproductiva dentro de un intervalo de edad entre los 18 y 38 años. Se analizó una muestra de 175 mujeres que cumplieron los criterios de inclusión: todas con un año o más de residencia en el lugar, quienes aceptaron participar voluntariamente y declararon no haber visitado al médico por problemas de infertilidad, no haber usado anticonceptivos durante el año anterior al primer embarazo; y tener como antecedente el abastecimiento de agua de la llave, de pozo o noria para su consumo.

El tamaño de la muestra permitió 95% de confiabilidad y 80% de poder estadístico con capacidad de discriminación entre regiones,

considerando 20% adicional al tamaño de la muestra por posibles pérdidas. Las mujeres fueron informadas de los objetivos del estudio de salud reproductiva sobre los efectos del consumo de agua con altos niveles de  $\text{N-NO}_3^-$  y otorgaron su firma de consentimiento informado para poder participar.

Las técnicas e instrumentos utilizados consideraron tres escenarios de exposición: alto, medio y bajo (tabla 1), según los niveles de nitrato encontrados en el agua de consumo humano conforme a la norma vigente. La invitación a participar fue realizada por personal de salud y del proyecto de investigación; a quienes accedieron, se les entrevistó en un local apropiado donde se les solicitó la información a través de un cuestionario. Aquellas que cumplieron con los criterios de inclusión fueron informadas acerca del proyecto, se les explicó que no habría represalias en relación a su participación o no en el protocolo y se les garantizó la privacidad de la información recolectada por medio de la firma de una carta de consentimiento informado. A todas las participantes se les tomó una muestra sanguínea para determinar el porcentaje de metaHb como biomarcador indirecto de exposición a  $\text{N-NO}_3^-$ .

### **Determinación de la concentración de $\text{N-NO}_3^-$ en agua de la red de consumo humano**

El muestreo del agua se realizó de acuerdo con 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 y en los pozos de distribución de agua, cada una de esas muestras se colocó en un recipiente de plástico herméticamente sellado y debidamente etiquetado con el número de pozo, los apellidos de la familia, su domicilio, y la fecha de recolección, para luego ser analizada en el laboratorio a una temperatura de 20° C. El análisis se

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  $N_3^-$ , 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 $N-NO_3^-$ 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  $N-NO_3^-$  encontrados en las localidades bajo estudio.

**Tabla 1. Concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de las localidades de estudio**

<b>Localidades nivel alto</b>	<b>Concentración mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>
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
<b>Localidades nivel medio</b>	
Juan E. García	15.0
Casas a la redonda	15.8 ± 1.02
<b>Localidades nivel bajo</b>	
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).

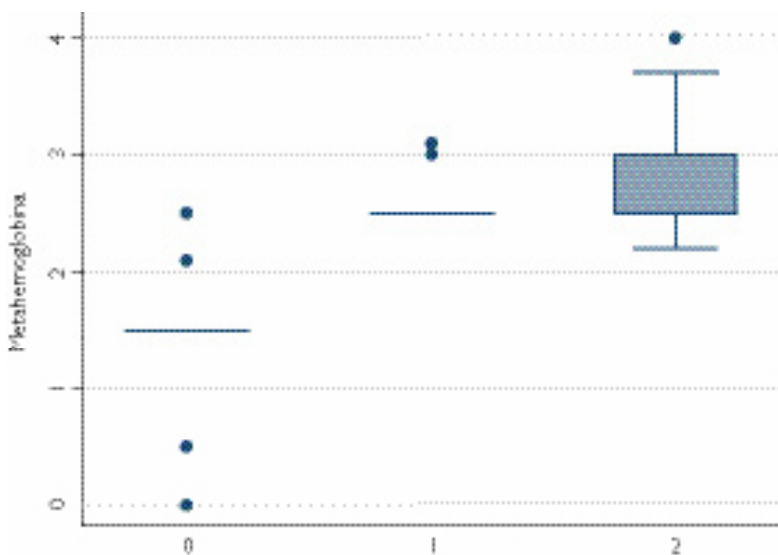
**Tabla 2. Niveles de metaHb y periodo menstrual en mujeres expuestas a nitratos en agua para beber.**

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**

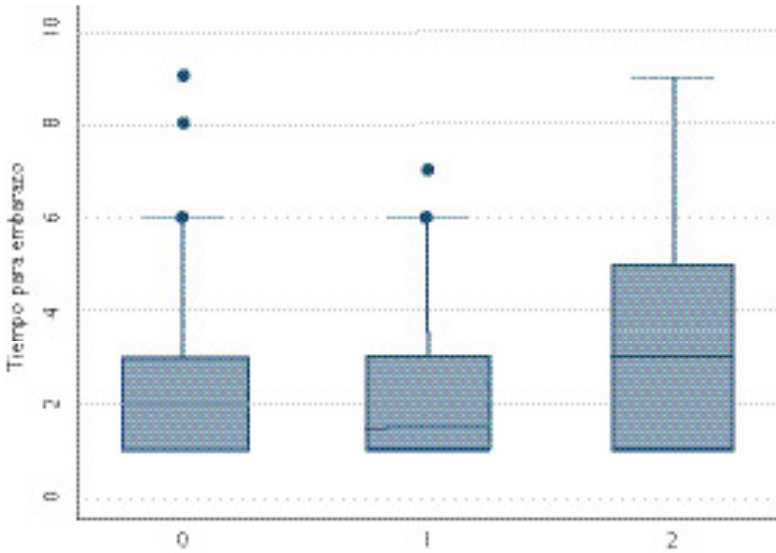


Fuente: elaboración propia

En el eje X: 0 corresponde a la localidad de exposición baja, 1 exposición media y 2 exposición alta, en el eje Y se graficó el % de metaHb (Kruskal Wallis  $p = 0.0001$ ).

Se analizaron los parámetros gestacionales en las mujeres expuestas a nitratos y se observó un retraso en el tiempo para embarazo, en meses, que fueron de  $2.7 \pm 2.29$ ,  $2.36 \pm 1.79$  y  $3.39 \pm 2.29$  en las zonas de baja, media y alta exposición respectivamente (tabla 3). Se observó una diferencia significativa en el tiempo para embarazo, según el grupo de exposición (Kruskal Wallis  $p = 0.008$ ) (figura 3).

**Figura 3. Tiempo para embarazo en mujeres expuestas a nitratos**



Fuente: Elaboración propia

En el eje X: 0 corresponde a la localidad de exposición baja, 1 a la de exposición media y 2 a exposición alta; en el eje Y se graficó el tiempo para embarazo en meses (Kruskal Wallis  $p = 0.0086$ ).

También se analizaron los resultados registrados del primer embarazo como: peso de la o el bebé al nacer, número de hijas o



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 <sup>¥</sup>	2.7 (2.29)	2.36 (1.79)	3.39 (2.29) **
Hijas(os) vivos sanos <sup>£</sup>	25 (83)	60 (90)	62 (78) **
Peso al nacer primer(a) hijo(a) <sup>¥</sup>	2972.5 (1135)	3030 (980.9)	2907 (1160.9)
Hijas(os) prematuros <sup>€</sup>	1	0	1
Hijas(os) con malformaciones <sup>€</sup>	0	0	3 **
Hijas(os) muertos <sup>€</sup>	2	1	4 **
Abortos <sup>£</sup>	2 (6.6)	5 (7.5)	10 (12.6) **
Enfermedad venérea de la pareja sexual <sup>£*</sup>	7 (23.3)	4 (6)	29 (36.7) **

<sup>¥</sup>  $\mu$  ( $\pm$  DE)

<sup>£</sup> n (%)

<sup>€</sup> 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  $\text{N-NO}_3^-$  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  $\text{N-NO}_3^-$  rebasan lo estipulado por la NOM-127-SSA1-1994. En este sentido, se encontraron comunidades con niveles de 25mg/L de  $\text{N-NO}_3^-$  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 prole, 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 methemoglobinaemia. *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

- of child-bearing age: a cross-sectional study. *Environmental Health*, 9(10), 2-17. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-10>
- Grosse, Y., Baan, R., Straif, K., Secretan, B., El Ghissassi, F. & Coglianò, V. (2006). Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *Lancet Oncology*, 7(8), 628-9. Recuperado en <https://pdfs.semanticscholar.org/58ae/e41c4f9606fce7adbebc8f91c180ab068638.pdf>
- Guo, S., Wu, J., Dang, T., Liu, W., Li, Y., Wei, W. & Syers, K. (2010). Impacts of fertilizer practices on environmental risk of nitrate in semiarid farmlands in the Loess Plateau of China. *Plant Soil*, 330(1-2), 1-13. doi: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0204-x>
- Hernández-Ramírez, R., Galván-Portillo, M., Ward, M., Agudo, A., González, C., Oñate-Ocaña L. (2009). Dietary intake of polyphenols, nitrate and nitrite and gastric cancer risk in Mexico City. *International Journal Cancer*, 125 (6), 1424-30. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.24454>
- Hord, N., Tang, Y. & Bryan, N. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *American Journal Clinical Nutrition*, 90(1), 1-10. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27131>
- Hord N. (2011). Dietary Nitrates, Nitrites, and Cardiovascular Disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 13(6), 484-492. doi: <https://doi.org/10.1007/s11883-011-0209-9>.
- Jansson, E., Huang, L., Malkey, R., Govoni, M., Nhlen, C., Olsson, A., ... & Lundberg, J. (2008). A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. *Nature chemical biology*, 4(7), 411-417. doi: <https://doi.org/10.1038/nchembio.92>
- Kim-Shapiro, D., Schechter, A. & Gladwin, M. (2006). Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 26(4), 697-705. doi: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a>
- Kyung-Taek R. (2017). Reproductive Toxic Chemicals at Work and Efforts to Protect Workers' Health: A Literature Review. *Safety and Health at Work*. Vol. 8(2). 143-150. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2017.04.003>
- Lynch, M. J, Raphael, S. S, Mellor, L. D, Spare, P. D. e Inwood, M. J. H. (1971). *Métodos de Laboratorio*, Tomo I. México: Nueva Editorial Interamericana, 470-476.
- Lou, J., Liu, Y., Hui, E., Gao, J., Bushell, M. & Hagen, T. (Mayo, 2010). Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1 ) Protein Synthesis by DNA Damage Inducing Agents. *Plos one*, 5(5), 1-14 doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010522>

- Lundberg, J., Gladwin, M., Ahluwalia, A. Benjamin N., Bryan N. S., Butler A., ... & Weitzberg E. (2009). Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nature Chemical Biology*, 5 (12), 865-9. doi: <https://doi/10.1038/nchembio.260>
- Lundberg, J., Weitzberg, E. y Gladwin, M. (2008). The nitrate-nitrite-NO pathway in physiology and therapeutics. *Nature. Reviews. Drug Discovery*, 7(2), 156-157. doi: <https://doi.org/10.1038/nrd2466>
- Manassaram, D., Backer, L., Messing, R., Fleming, L., Lucke, B. & Monteilh, C. (2010). Nitrates in drinking water and methemoglobin levels in pregnancy a longitudinal study. *Environmental Health*, 9(60), 2-12. doi: <https://doi.org/10.1186/1476-069X-9-60>
- Manukhina, E., Downey, H. & Mallet, R. (2006). Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia. *Experimental Biology and Medicine*, 231(4), 343-365.
- McElroy, J., Trentham-Dietz, A., Gangnon, R., Hampton, J., Bersch, A. & Kanarek, M. Newcomb P. A. (2008). Nitrogen-nitrate exposure from drinking water and colorectal cancer risk for rural women in Wisconsin, USA, *Journal of Water and Health*, 6(3), 399-409. doi: <https://doi.org/10.2166/wh.2008.048>
- Mensinga, T., Speijers, G. & Meulenbelt, J. (2003). Health implications of exposure to Environmental nitrogenous compounds. *Toxicological Reviews*, 22(1), 41-51
- Njeze, G., Dilibe, U. & Ilo, C. (2014). Nitrate and drinking water from private wells: Will there be an epidemic of cancers of the digestive tract, urinary bladder and thyroid? *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 17(2), 178-82. doi: <https://doi.org/10.4103/1119-3077.127543>
- Petersson, J., Phillipson M., Jansson E. A., Patzak A., Lundberg J. O., Holm L. (2007). Nitrate, nitrite and nitric oxide in gastric mucosal defense. *American Journal of Physiology gastrointestinal and liver physiology*, 292(3), 718-24. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00435.2006>
- Santamaria, P., Elia, A., Gonnella, M., Parente, A. & Serio, F. (2011). Ways of reducing rocket salad nitrate content. *Acta Horticulture*, 548, 529-537. doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.548.64>
- Ward, M., Dekot, T., Levallois, P., Brender, J., Guilis, G., Nolan, T., Van Derslice, J. & International Society of Environmental Epidemiology (2005). Workgroup report: Drinking-water nitrate and health- recent findings a research needs. *Environ Health Perspectives*, 113(11), 1607-14.
- Ward, M. H., Heineman, E. F., Markin, R. S. & Weisenburger, D. D. (2008). Adenocarcinoma of the stomach and esophagus and drinking water and dietary sources of nitrate and nitrite. *International Journal Occupational and Environmental Health*, 14(3), 193-7. doi: <https://doi.org/10.1179/oe.2008.14.3.193>

- Ward, M., Aschebrook-Kilfoy, B., Weyer, P., Anderson, K., Folsom, A., y Cerhan, J. (2010). Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease. *Epidemiology*, 21(3), 389-95. doi: <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181d6201d>
- Webb, A. J., Milsom, A. B., Rathod, K. S., Chu, W. L., Qureshi, S., Lovell M.J., ... & Ahluwalia, A. (2008). Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrate reduction to nitric oxide in hypoxia: Role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 103(9), 957-964. doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.175810>
- World Health Organization (2004). *Guidelines for Drinking Water Quality*. 3rd ed. (pp. 22-35) Suiza: World Health Organization.
- Xi, L., Zhu, S. G., Das, A., Chen, Q., Durrant, D. C., Hobbs, D. C., ... & Kukreja, R. C. (2012). Dietary inorganic nitrate alleviates doxorubicin cardio toxicity: Mechanisms and implications. *Nitric Oxide*, 26(4), 274–284. doi: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.006>





---

## SEMBLANZAS DE LAS AUTORAS

### **María Evarista Arellano García**

Doctora en Medio Ambiente y Desarrollo. Tiene la Maestría en Manejo de Ecosistemas. Es profesora-investigadora de la Universidad Autónoma de Baja California, adscrita a la Maestría en Manejo de Ecosistemas y el Doctorado en Ciencias e Ingeniería en Facultad de Ciencias. Integrante del Sistema Nacional de Investigadores.

### **Jaqueline Calderón Hernández**

Doctora en Ciencias Biomédicas Básicas por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Maestra en Ciencias en Salud Ambiental por la Escuela de Salud Pública de México. Es química farmacobióloga por la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP. Se desempeña como profesora-investigadora en la UASLP. Integrante del Sistema Nacional de Investigadores.

### **Esperanza Jazmín Calleros Rincón**

Doctora en Ciencia y Tecnología Ambiental por el CIMAV de Chihuahua, en donde obtuvo un reconocimiento de excelencia académica. Tiene la Maestría en Salud Ocupacional y Ambiental, por la Facultad de Medicina de Gómez Palacio. Es médico cirujano y partero por la Facultad de Medicina, de la Universidad Juárez del

Estado de Durango. Es profesora-investigadora de tiempo completo adscrita a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Posee el reconocimiento del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (Prodep).

### **Lourdes Camarena Ojinaga**

Doctora en Ciencias Sociales por El Colegio de la Frontera Norte, con Maestría en Ciencias de la Salud Pública en la Universidad de Guadalajara y Licenciatura en Psicología por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Actualmente es profesora-investigadora de tiempo completo de la Facultad de Ciencias Administrativas y Sociales de la Universidad Autónoma de Baja California. Integrante del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) y del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (Prodep).

### **María Teresa Castillo Burguete**

Doctora en Antropología Social por la Universidad Iberoamericana. Maestra en Desarrollo Rural por la UAM-Xochimilco. Es investigadora titular y docente en el Departamento de Ecología Humana del Cinvestav. Integrante del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

### **Dora Virginia Chávez Corral**

Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Cuenta con la Especialidad en Embriología por la Universidad Autónoma de Nuevo León. Es médico cirujano y partera, por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Actualmente está adscrita como profesora-investigadora en la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

### **Martha Elena Loya Loya**

Maestra en Salud en el Trabajo por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Es química bacterióloga parasitóloga por la Universidad Autónoma de Chihuahua. Es profesora-investigadora en el

Departamento de Microbiología Clínica de la Facultad de Odontología de la UACH.

**Concepción Martínez Valdés**

Maestra en Antropología Cultural por la Columbia University. Cuenta con la Licenciatura en Lingüística por la Georgetown University. Actualmente es profesora-investigadora de tiempo completo en la Facultad de Ciencias Administrativas y Sociales de la Universidad Autónoma de Baja California.

**Rebeca Mejía Saucedo**

Maestra en Ciencias Biomédicas Básicas por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Es química farmacobióloga por la Facultad de Ciencias Químicas de la UASLP. Se desempeña como técnico académico en la Facultad de Medicina de la UASLP.

**Norma Elena Pérez Herrera**

Es doctora en Toxicología por el Cinvestav. Profesora de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán y responsable del Laboratorio de Enfermedades Crónicas y Degenerativas de la Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica. Integrante de Redes Temáticas Conacyt.

**Rebeca Pérez Morales**

Doctora en Ciencias Biomédicas por la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde obtuvo mención honorífica por su excelente trayectoria. Maestra en Ciencias (Biología Experimental) por la UNAM. Es bióloga por la Facultad de Ciencias de la UNAM. Se ha desempeñado como docente-investigador en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Integrante del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).

### **Andrea Guadalupe Rodríguez López**

Es estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas Básicas de la Facultad de Medicina de la UASLP. Maestra en Ciencias Biomédicas Básicas por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Licenciada en Biofísica por la Facultad de Ciencias de la UASLP. Actualmente es docente de la Facultad de Ingeniería de la UASLP.

### **Adriana Leona Rosales Mendoza**

Doctora y maestra en Ciencias Antropológicas (UAM-I), en donde obtuvo la medalla al Mérito Académico “Incalli Ixcahuicopa” en ambos posgrados. Posdoctorado en Ciencias en Salud Pública en Epidemiología en el Instituto Nacional de Salud Pública de México. Licenciada en Sociología por la UAM-X. Profesora-investigadora Titular C, adscrita al Área “Diversidad e Interculturalidad” de la Universidad Pedagógica Nacional. Integrante del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) y del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (Prodep).

### **Luz Helena Sanín Aguirre**

Doctora en Ciencias en Epidemiología por el Instituto Nacional de Salud Pública. Realizó estudios de Maestría en Salud Pública en el Instituto Nacional de Salud Pública. Es médico cirujano, egresada de la Universidad Nacional de Colombia. Está adscrita a la Universidad Autónoma de Chihuahua. Integrante del Sistema Nacional de Investigadores (SNI) y evaluadora nacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

### **Margarita Elena Tapia Fonllem**

Doctora en Ciencias Sociales por la Universidad de Sonora, maestra y licenciada en Sociología, por la Facultad de Ciencias Políticas y Sociales de la UNAM. Actualmente es profesora-investigadora de tiempo completo en la Universidad Pedagógica Nacional, Unidad Ajusco.

**Mayra Vera Avilés**

Estudiante del Doctorado en Nutrición y Diabetes en la Universidad King's College London en Reino Unido. Maestra en Ciencias con Especialidad en Ecología Humana por el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav). Es docente de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Yucatán.

**Christine Von Glascoe**

Doctora en Ciencias Sociales por la Universidad de California-Irvine. Es antropóloga por la Universidad de California-Irvine. Es médico cirujano y partera por El Centro de Estudios Universitarios Xochicalco, en Baja California. Se desempeña como profesora-investigadora en el Departamento de Estudios de Población, Línea de Salud Pública, de El Colegio de la Frontera Norte.

**Leticia Yáñez Estrada**

Doctora en Ciencias Biomédicas Básicas con especialidad en Toxicología Ambiental por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP). Es jefa del Laboratorio de Género, Salud y Ambiente y profesora-investigadora de tiempo completo de la Facultad de Medicina de la UASLP. Es integrante del Sistema Nacional de Investigadores (SNI).



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

Juan Manuel Ocegueda Hernández *Rector*  
Alfonso Vega López *Secretario General*  
Blanca Rosa García Rivera *Vicerrectora Campus Ensenada*  
Ángel Norzagaray Norzagaray *Vicerrector Campus Mexicali*  
María Eugenia Pérez Morales *Vicerrectora Campus Tijuana*

---

**SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA**

Otto Granados Roldán *Secretario de Educación Pública*  
Rodolfo Tuirán Gutiérrez *Subsecretario de Educación Superior*

**UNIVERSIDAD PEDAGÓGICA NACIONAL**

Tenoch Esaú Cedillo Ávalos *Rector*  
Elsa Lucía Mendiola Sanz *Secretaría Académica*  
Omar Alberto Ibarra Nakamichi *Secretaría Administrativa*  
Alejandra Javier Jacuinde *Directora de Planeación*  
Martha Isela García Peregrina *Directora de Servicios Jurídicos*  
Fernando Velázquez Merlo *Director de Biblioteca y Apoyo Académico*  
Xóchitl Leticia Moreno Fernández *Directora de Unidades UPN*  
María Teresa Brindis Pérez *Dirección de Difusión y Extensión Universitaria*

Formación UPN *María Eugenia Hernández Arriola*  
Diseño de portada UPN *Angélica Fabiola Franco González*  
Ilustración de portada UABC: José María Guerra Osorio  
Corrección de estilo UABC



---

Esta primera edición de *Salud reproductiva, medio ambiente y género. Un diálogo necesario* estuvo a cargo de la Subdirección de Fomento Editorial, de la Dirección de Difusión y Extensión Universitaria, de la Universidad Pedagógica Nacional y la Universidad Autónoma de Baja California y se publicó el 31 de julio de 2018.

## Diagnosis of Caprine Brucellosis by Serology and Multiple PCR

Raúl A. Cuevas-Jacquez<sup>1</sup>, José L. Ortega-Sánchez<sup>2</sup>,

Maribel Cervantes-Flores<sup>4</sup>, Rebeca Pérez-Morales<sup>1</sup>, Sandra I. Hernández-González<sup>1</sup>, José J Alba-Romero<sup>1,3</sup>,  
Aurora Martínez-Romero<sup>1,1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación, Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) Campus Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), Durango (Dgo.), México.

<sup>2</sup>Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo, Dgo.

<sup>3</sup>Laboratorio de Asesores Especializados de la Laguna, Gómez Palacio, Dgo.

<sup>4</sup>FCQ, Campus Durango Laboratorio de Inmunología e Infectología. UJED. Dgo.

---

**Abstract:** Our aim was to perform the diagnosis of caprine brucellosis by serology and multiple Polymerase Chain Reactions (PCR). The field work was conducted on the Ejidos la Victoria Municipio Tlahualilo Public Lands of San José de Bellavista y Bermejillo, Mapimí Municipality, state of Durango, Mexico. Meetings were held with the producers to explain to them the objectives and benefits to be obtained with the carrying out of this investigation. Samples were taken from 114 native breed animals crossed with Saanen and Alpine breed animals from the jugular vein, obtaining 114 blood samples in tubes without anticoagulant for the obtention of serum in order to process the Rose Bengal Plate Test (RBPT) and 114 whole blood samples for processing multiple PCR. We carried out DNA extraction of control strains of *Brucella abortus* RB51 and *Brucella melitensis* RM1 employing the phenol:chloroform:isoamyl alcohol method with the oligonucleotide sequence of *Brucella* genus, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, and IS711. General seroprevalence was 26.31% and seroprevalence by Tlahualilo Municipality was 41.86%, while this in Mapimí was 18.18%. In the multiple PCR sample analysis, we found that 30 samples corresponded to *B. melitensis*, obtaining 100% sensitivity and specificity. The PCR technique described in this study presented 100% sensitivity and specificity with the RBPT, allowing for the simultaneous identification, between and genus and species, the implementation of the multiple-PCR variant capable of identifying different species of the *Brucella* genus, the latter leading to a better diagnosis of the disease.

**Keywords:** *Brucella melitensis*, goats, sensitivity, specificity.

---

### I. Introduction

Brucellosis is cataloged as a bacterial zoonosis found worldwide whose genus is *Brucella* and that consists of multiple species [1]. Its incidence ranges from between 1.3 and 70.0 cases per 100,000 inhabitants, differences due to the characteristics of each nation. Mexico is one of the countries with the greatest incidence of human brucellosis in Latin America, causing economic losses generated in domestic cattle-raising and its impact on public health [2]. The highest brucellosis incidence rates were found in bovines, followed by caprines and ovines. The genus *Brucella* includes three important species for human pathology: *Brucella melitensis*, which preferentially affects goats, but that can affect bovines and pigs. In Mexico, the highest incidence of bovine brucellosis is observed in stabled livestock and in high-animal-density areas, such as the central, southeastern, and coastal zones. Caprine brucellosis possesses a wider distribution with greatest frequency registered in entities with high goat concentrations [3].

At present, the Mexican Ministry of Health carries out educative health activities, informing the population of the public health problem represented by the consumption of non-pasteurized lactic products and contact with the meat of animals suffering from brucellosis. Preventive measures for professional risk include the following: consume pasteurized milk, subproducts, and derivatives of these, rejecting those of doubtful origin; limit close cohabitation with animals; wash hands with soap and water before eating and after contact with animal or subproducts and waste; cleanliness, disinfection, and separation by means of fences in places for the raising/breeding of livestock (caprine, bovine, and porcine); identification and elimination of sick animals and vaccination prior to 3 months of age; timely stimulation of medical care and treatment termination; motivation of the medical and paramedical area to conduct patient follow-up at 30, 60, 90, and 120 days, and maintain surveillance of blood donors being brucellosis-negative [4].

Maximal focus cases have been reported of up to 18.3% of brucellosis in humans, caused by the ingestion of caprine- and ovine-origin lactic products in which *B. abortus* and *B. melitensis* were involved.

---

<sup>1</sup> Correspondencia: E-mail: [quimicaaurora@hotmail.com](mailto:quimicaaurora@hotmail.com)

Artículo 123 s/n Colonia Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México

Mexico places worldwide as one of the regions with the greatest prevalence of bovine brucellosis, with 3.42% seropositivity in humans. In the Mexican state of Zacatecas, the campaign against brucellosis is found in the control phase. Brucellosis prevalence at the domestic level in herds/flocks was 2.94% and 0.61% in heads of cattle; thus, it is referred that caprine brucellosis was determined as 10.35%, and for ovine brucellosis, this was 0.61% for the same year [5].

Reinforcing zoosanitary status has repercussions on public health, in that it mitigates the risk of contagion in humans due to the consumption of unpasteurized lactic products[6]. The Comarca Lagunera is a brucellosis-endemic zone, and this disease tends toward chronicity due to ignorance in terms of its diagnosis, treatment, and implications for public health, in that it causes arthritis, endocarditis, meningitis, and osteomyelitis, while it also leads great economic losses on being a zoonosis.

In that brucellosis is a zoonosis, it is economically important for humans and livestock, and its worldwide distribution is caused by Gram-negative bacteria, facultative intracellular, that belongs to the genus *Brucella*. The identification and differentiation of *Brucella* species is based on the culture, a long and laborious process, in addition to there being a risk of infection. Although the serodiagnosis of brucellosis is performed by means of the detection of specific antibodies, it is necessary to confirm the result with molecular methods. Therefore, the study of novel techniques that improve the diagnosis of this disease is fundamental.

In addition, there is scarce information on the relative knowledge of the blood profile in goats with brucellosis; thus, it is pertinent to know the changes among the biochemical and hematological metabolites that can reflect the effects of brucellosis on animal health. Because with a zoonosis, it is essential to know the hematological and blood biochemical values, in that they are indispensable indicators for carrying out diagnostic health evaluations at the individual as well as at the population level. Having access to reference data supplied by healthy persons contributes to the early detection of individual diseases and/or organic dysfunctions. Therefore, the objective of the present investigation was to perform a comparison between the serological and molecular method in the diagnosis of brucellosis with multiple PCR multiple in healthy bovine cattle and in those with brucellosis.

## II. Materials and Methods

### Type, place of study, and ethical aspects

The present analytical study was approved by the Research Ethics Committee of the FCQ of the University of the State of Durango (UJED) N°123301538X0201 COFEPRIS. The field work was carried out in the Ejidos la Victoria Municipio Tlahualilo Public Lands, San José de Bellavista y Bermejillo, Mapimí Municipality, state of Durango, Mexico. Meetings were held with the producers to explain the objectives and benefits to be obtained with the performance of this investigation. The sampling was consecutive in gestating goats 12 months of age with and without brucellosis. We collected approximately 10 mL of blood per goat; sampling was conducted in tubes<sup>2,3</sup>, and immediately afterward, the tubes were transported in coolers for their processing. The serum was separated from the blood by centrifugation<sup>4</sup> at 3,000 rpm during 10 min.

Each sample was labeled utilizing codes that described each animal. One hundred fourteen native goats crossed with Saanen and Alpine breeds were sampled by the jugular vein, obtaining blood samples in a tube with anticoagulant to obtain the serum for processing by means of the RBPT<sup>5</sup> at the Regional University Unit of Arid Zones (URUZA) of the Autonomous University of Chapingo (UACH) and 114 samples of whole blood for multiple PCR processing at the FCQ, Durango Unit, UJED. We carried out DNA extraction of the control strains of *Brucella abortus* RB51 and *Brucella melitensis* RM1 employing the phenol:chloroform:isoamyl alcohol method with two wrinkled *B. abortus* RB51 and *B. melitensis* RM1 control strains, with the oligonucleotide sequence of *Brucella* genus (BG), *Brucella abortus* (BA), *Brucella melitensis* (BM), *Brucella suis* (BS), and IS711 (IS). Meetings were held for the producers to explain the objectives and benefits to be obtained with the performance of this investigation. We performed multiple PCR applying this to each of the samples: Identification of *Brucella* spp. was based on the amplification of the genomic region of the *bcs31*<sup>6</sup> gene. The DNA sequence constituted by the animals' feeders [7] is shown in table 1.

### DNA extraction of control strains

To carry out the genomic extraction of the control strains of *Brucella*, this began from a 5-day growth in Trypticase Soy Agar (TSA) broth. We placed 1.5 mL of culture in an Eppendorf tube and centrifuged this for 2 min at 13,000 rpm. The supernatant was eliminated and the cellular pellet was resuspended in 1 mL of lysis

<sup>2</sup>BD Vacutainer® Suero/SERUM 13 × 100 mm.

<sup>3</sup>BD Vacutainer® K2E/K2 EDTA 13 × 75 mm.

<sup>4</sup>SOLBAT® Modelo C-600, México.

<sup>5</sup>ABA test card at 3% *Brucella Abortus* Antigen (BAA), PRONABIVE® México.

<sup>6</sup>GenBank access #M20404.

buffer (EDTA 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7.5), was mixed in a vortex until resuspension, and was centrifuged for 2 min at 13,000 rpm to recover the bacterial pellet again and the supernatant was eliminated. To recover this, we resuspended this again in 300  $\mu$ L of lysis buffer. After this, we added 100  $\mu$ L of lysozyme (10 mg/mL) drop-by-drop and shook this with a vortex; the mixture was incubated for 15 min at 37°C. We added, to the cellular extract, 30  $\mu$ L of Sodium DiSulfate (SDS) at 20% and incubated this at 37°C during 5 min. We extracted the lysate with a similar volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (24:25:1) u/u; this was mixed and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min (206.4:215:8.67  $\mu$ L) [8]. The aqueous phase was transferred, we added 30  $\mu$ L of sodium acetate 3M, and filled the tube with cold ethanol at 95%. We inverted the tube, observing that the chromosomal DNA formed a pellet. The DNA was left to dry and later was resuspended in nuclease-free water. Finally, we proved the presence and integrity of the DNA in agarose gel 1% stained with Ethidium Bromide (EtBr) 0.5 mg/mL, after having submitted it to electrophoresis (120 V/208 mA) in a Tris-Acetate-EDTA (TAE) 1X buffer. DNA concentration and purity were calculated in NanoDrop™<sup>7</sup> by means of a 260/280 ratio.

#### **Extraction of genomic DNA in whole blood**

Extraction of genomic DNA in whole blood consisted of placing 500  $\mu$ L of whole blood in an Eppendorf tube, to which we added 1 mL of red-blood lysis solution, 0.01 M Tris-HCl pH 7.6, 320 mM sucrose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1% Triton X 100<sup>8</sup>. This was centrifuged at 7,000 rpm for 2 min, the supernatant was discarded, and this step was repeated two or three times until we observed no excess of hemoglobin. We added 400  $\mu$ L of nucleic-acid lysis solution (0.01 M Tris-HCl, 11.4 mM sodium citrate, 1 mM EDTA, and 1% of SDS). We then added 100  $\mu$ L of NaCl (5 M) and 600  $\mu$ L of CHCl<sub>3</sub>; this was centrifuged at 7,000 rpm for 2 min and we transferred 400  $\mu$ L of the supernatant into a new tube. We added to this 800  $\mu$ L of cold absolute ethanol (-20°C), vortexed it, and afterward, centrifuged it for 1 min at 12,000 rpm. Finally, we added 50  $\mu$ L of TE to conserve the DNA at 4°C until its use. The DNA integrity was observed in agarose gel at 1% stained with EtBr 0.5 mg/mL after having been submitted to electrophoresis (120 V/208 mA) in a TAE 1X buffer. DNA concentration and purity was calculated in NanoDrop™ by means of a 260/280 ratio.

#### **Conditions of multiple PCR**

Multiple PCR was carried out in the whole blood samples as well as in the genomic DNA of the strain. This was performed in a total volume of 25  $\mu$ L of reaction that contained the following: 5  $\mu$ L of PCR buffer reaction; 0.2 mM of each deoxyNucleotideTriPhosphate (dNTP), and 1.5 mM of MgCl<sub>2</sub>. The feeders were mixed at concentration of 800 nM BG-F and -R, 600 nM of IS, 350 nM of *Brucellaabortus* (BA), 450 nM of *BrucellaSuis*(BS), and 200 nM of *Brucellamelitensis*(BM). We added, for each reaction, 2  $\mu$ L (~500 pg) of DNA template and 1 U of Taq polymerase [7].

Amplification consisted of an initial denaturalization at 95°C during 1 min, 30 amplification cycles with denaturalization at 95°C during 5 sec, hybridation at 64°C during 10 sec, extension at 72°C during 30 sec, and a final extension at 72°C during 1 min in the thermocycler<sup>9</sup>. The presence and integrity of the genomic DNA of the PCR products were proven in agarose gel 1%<sup>10</sup>, stained with EtBr 0.5 mg/mL after having been submitted to electrophoresis (120 V/208 mA) in a TAE 1X buffer.

### **III. Results**

General seroprevalence was 26.32%, and for Tlahualilo Municipality this was 41.86%, while in Mapimí it was 18.18%. We observed the band pattern of the strains of each species. We carried out the determination of DNA concentration and purity obtained employing NanoDrop™ equipment, the results of which were as follows: for the *B. melitensis*RM1 strain, there was a concentration of 149 ng/ $\mu$ L and 1.7 purity in the 260/280 ratio, while for the *B. abortus* RB51 strain, there was a concentration of 120 ng/ $\mu$ L and 1.7 purity.

#### **Extraction of Genomic DNA of Whole-blood Samples**

The application of multiple PCR in this study required having an adequate DNA-extraction method of blood samples, due to that *Brucella* is an intracellular-growth microorganism it is fundamental for the bacterial DNA (if it were to exist in the sample) to be extracted from the interior of the macrophage which is where it inhabits, in the most integral form possible and at concentrations that are adequate for performing its later amplification. We observed an average concentration of 230 ng/ $\mu$ L with a Standard Deviation (SD) of 15.7 and 1.63 purity with an SD of 1.5 in the 260/280 ratio, which permitted us to perform amplification of the samples.

---

<sup>7</sup>ThermoScientificNanoDrop™ 2000®, USA.

<sup>8</sup>Sigma-Aldrich®, USA.

<sup>9</sup>MyCycler, Bio-Rad®, USA.

<sup>10</sup>Agarose, LE, Analytical grade, Cat. # V3125 Promega®, Spain.

### Multiple PCR

We carried out DNA amplification of the control strains to determine their band pattern. We observed that the band that defined the genus *Brucella* determined by feeders of the *bcs31* gene genomic region presents 208 pb, while bands of the species *B. abortus* and *B. melitensis* that are determined by the feeders that are directed to the specific integration of element IS711 in the genome of the respective species evidenced the *B. melitensis* species in the 731-pb band and the *B. abortus* species, in the 498-pb band (figure 1).

On analysis of the samples that were RBPT-positive, on processing the multiple PCR, we found that these samples corresponded to *B. melitensis* with a 731-pb band (figure 2).

### Sensitivity and Specificity of the Multiple PCR Technique for Diagnosis of Brucellosis

To determine the sensitivity and specificity of the multiple PCR technique, we employed the Odds Ratio (OR) statistical method, utilizing BR as the standard diagnostic test. On applying the  $2 \times 2$  table, we obtained the sensitivity, specificity, Positive Predictive Value (PPV), and Negative Predictive Value (NPV) described in tables 2 and 3.

## IV. Discussion

At present, there are specific diagnostic methods of brucellosis, including serological, molecular, or microbiological methods, and RB continues to be utilized as a diagnostic test [9]. Molecular tests permit us to know the species of the genus *Brucella*. Diverse authors have reported techniques for the molecular diagnosis through PCR and have cited its high sensitivity and specificity employing PCR assays in real time. Nagalingam and collaborators in 2012 reported that by means of serological tests, it is not possible to differentiate positive brucellosis in infected and in vaccinated animals; however, through the multiple PCR technique, it is possible to differentiate between vaccine strains S19, RB51, and Rev1 and infecting strains of the genus *Brucella* of livestock and humans [10]. In this study, multiple PCR was carried out in whole blood samples, such as the genomic DNA of the strain, conditions that have already been considered in the identification of the genus and species of *Brucella*, on which multiple PCR was performed directly from clinical samples, affording certainty to the diagnosis. In this respect, it has been determined that the identification of *Brucella* spp. by conventional tests involve time, risk, and requires interpretation by an expert, while the PCR technique is rapid, sure, and easy to interpret. In the present investigation, 30 serum samples were confirmed as positive for RBPT, and from the same sampling with 30 samples of whole blood, the isolation was confirmed of *B. melitensis* with multiple PCR. In the same manner, Irajian et al. analyzed 68 isolations by PCR from humans as well as from animals, among which *B. melitensis* predominated in 36 isolates, two of *B. abortus* and one of *B. suis* of the animal specimen, and 24 isolates of *B. melitensis* and six of *B. abortus* of the human specimen [8]. In this regard, it was documented that *B. melitensis* presents very severe clinical conditions in humans [2].

In the present work, in the results of the amplification of the RBPT-negative samples, bands were observed, with which we obtained 100% sensitivity and specificity; thus, PPV and NPV were 100%. Cevallos and coworkers (2010) also performed a conventional PCR technique, obtaining a sensitivity value of 75% and one of 92% for specificity, in comparison with the RBPT technique [11]. On developing the PCR technique utilizing whole blood, it was observed that the technique is fast, that its manipulation is facilitated, and that it diminishes the risk of infection; in addition, it allowed for simultaneous identification of the genus and the species due to the use of the multiple-PCR variant, and it provides overwhelming epidemiological reports due to that it identifies the most prevalent species in a determined population. The latter renders the technique feasible for it to be applied in the diagnostic laboratory.

In addition to the consumption of unpasteurized lactic products, due to which it is necessary to provide technical advice to small producers on the knowledge of brucellosis, of how to prevent the infection in order to not only control the latter, but also to eradicate it from brucellosis-endemic zones. The results of this demonstrate that PCR is an effective method for identifying brucellosis in humans from peripheral-blood samples. Also, PCR could be employed as a rapid and confirmatory instrument for samples for which a doubt arises in terms of RBPT. For future investigations, it is recommendable to utilize multiple PCR for the diagnosis of the different species of the genus *Brucella* because it amplifies different DIANA sequences, as well as the simultaneous identification of diverse genes. It is recommended to process multiple PCR such as Western blot that detects specific proteins, in that there are cases in which genes are detected that encode for toxins or other virulence factors.

## V. Conclusion

The multiple PCR technique described in this study can be utilized for the diagnosis of human brucellosis employing whole blood as sample analysis. Also, it possesses a high grade of sensitivity and specificity as a diagnostic test: Its rapidity is noteworthy in addition to that its economy of resources renders it feasible for its application in the diagnostic laboratory. The results demonstrate that RBPT continues to be an

inexpensive and totally reliable test for performing a good diagnosis of human brucellosis in the absence of PCR for a population with a high level of antibodies in endemic areas.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Maggie Brunner for English reviewing of the manuscript.

### References

- [1]. Bai Y, Urushadze L, Osikowicz L, McKee C, Kuzmin I, Kandaurov A, et al. Molecular Survey of Bacterial Zoonotic Agents in Bats from the Country of Georgia (Caucasus). PLoS ONE 2017;12:e0171175.
- [2]. Méndez-Lozano M, Rodríguez-Reyes EJ, Sánchez-Zambrano LM. Brucellosis, una zoonosis presente en la población: estudio de series de tiempo en México. Salud Pública de México. 2015; 57:519-527.
- [3]. Sánchez EO, Ortega JL. Caprine brucellosis seroprevalence in three municipalities of the state of San Luis Potosí, México;2007:141–146.
- [4]. SSA. Zoonosis y vectores. Secretaría de Salud. Instituto de Salud del Estado de México. 9 Mayo 2017. salud.edo.mx/html/article.php?sid=332
- [5]. SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Evaluación Alianza para el Campo 2005. Informe de Evaluación Estatal Subprograma de Salud Animal. 2006. <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/zacatecas/Documents/Evaluaciones%20Externas/2005/Salud%20Animal%202005.pdf>
- [6]. SAGARPA. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación actual. Campaña Nacional contra la brucelosis de los animales NOM-041-ZOO-1995. 21 agosto 2015. <http://www.senasica.gob.mx/?id=4414>
- [7]. Irajian GR, Masjedian Jazi F, Mirnejad R, Piranfar V, Zahraei Salehi T, Amir Mozafari N, et al. Species-specific PCR for the Diagnosis and Determination of Antibiotic Susceptibilities of *Brucella* Strains Isolated from Tehran, Iran. Iran J Pathol 2016;11: 238-247.
- [8]. Garshasbi M, Ramazani A, Sorouri R, Javani S, Moradi S. Molecular detection of *Brucella* species in patients suspicious of Brucellosis from Zanjan, Iran. Braz J Microbiol 2014;45:533-538.
- [9]. Assenga JA, Matamba LE, Muller SK, Malakalinga JJ, Kazwala RR. Epidemiology of *Brucella* infection in the human, livestock and wildlife interface in the Katavi-Rukwa ecosystem, Tanzania. BMC Vet Res 2015;11:189.
- [10]. Nagalingam M, ShomeR, BalamuruganV, ShomeBR, NarayanaRaoK, Vivekananda, et al. Molecular typing of *Brucella* species isolates from livestock and human. Trop Anim Health Prod 2012;44:5-9.
- [11]. Cevallos-Falquez O, Carranza-PatiñoM, Saucedo-AguiarS, Romero-GaraicoaD, Ramos-GavilanesL, Reyes-ChancayX, et al. Diagnóstico Serológico (Rosa de Bengala) y Molecular (PCR) de Brucelosis en Humano. Ciencia y Tecnología 2010;3:27-32.

**Table 1.** Primers for detection of *Brucella* using specific Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

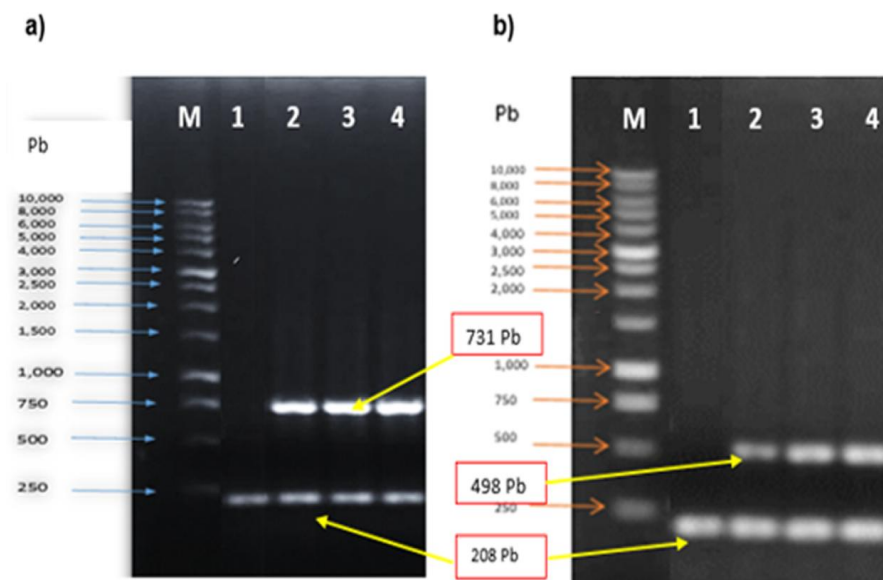
	Sequence 5' - 3'
<i>Brucella</i> genus	F: CAATCTCGGAACTGGCCATCTCGAACGGTAT R: ATGTTATAGATGAGGTCGTCCGGCTGCTTGG
<i>B. abortus</i>	GACGAACGGAATTTTTCCAATCCC
<i>B. melitensis</i>	AAATCGCGTCCTTGCTGGTCTGA
<i>B. suis</i>	GCGCGGTTTTCTGAAGGTTTCAGG
IS711	TGCCGATCACTTAAGGGCCTTCA

**Table 2.** Use of the 2 × 2 table for the evaluation of the diagnostic test.

Result of multiple PCR	Result of RBPT		Total
	Positive	Negative	
Positive test	30	0	30
Negative test	0	84	84
Total	30	84	114

**Table 3.** Values of sensitivity, specificity, Positive Predictive Value (PPV), and Negative Predictive Value (NPV).

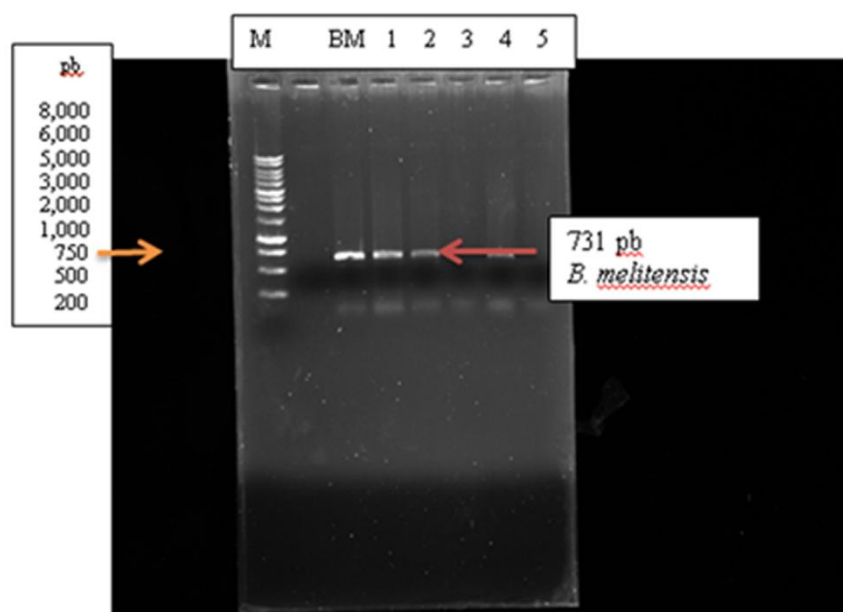
	Value (%)
Sensitivity	100
Specificity	100
PPV	100
NPV	100



**Figure 1.** Multiple Polymerase Chain Reaction (PCR) of the control strains. Electrophoresis in agarose gel at 1%, stained with EtBr, showing in M the molecular weight marker of Kb.

**a) Products of the multiple PCR of the control strain of *Brucella melitensis* RM1.** Lane 1: Amplification utilizing solely the genus feeders (with a 208-pb band corresponding to the genus *Brucella*); Amplification **Lanes 2–4** utilizing these genus and species feeders (a >731-pb band corresponding to the species *Brucella melitensis*).

**b) The multiple PCR products of the control strain of *B. abortus* RB51.** Lane 1: Amplification only utilizing the feeders of the genus (with a 208-pb band corresponding to the genus *Brucella*); **Lanes 2–4**, amplification employing feeders of the genus and species (a >498-pb band corresponding to the species *B. abortus*).



**Figure 2.** Multiple PCR of Rose Bengal (RB)-positive samples.

# We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists

4,100

Open access books available

116,000

International authors and editors

120M

Downloads

Our authors are among the

154

Countries delivered to

TOP 1%

most cited scientists

12.2%

Contributors from top 500 universities



WEB OF SCIENCE™

Selection of our books indexed in the Book Citation Index  
in Web of Science™ Core Collection (BKCI)

Interested in publishing with us?  
Contact [book.department@intechopen.com](mailto:book.department@intechopen.com)

Numbers displayed above are based on latest data collected.  
For more information visit [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com)





## Chapter

# The Endemism of the Vascular Flora of Mexico Present in Comarca Lagunera, an Agricultural Region in the Chihuahuan Desert

*Alberto González-Zamora and Rebeca Pérez-Morales*

## Abstract

A study of the distribution of 321 taxa of endemic vascular plants of Mexico distributed in Comarca Lagunera, a region of northern central Mexico within the Chihuahuan Desert, was conducted. The analysis consisted in detecting the areas of high richness and with this information propose areas for the conservation of plant biodiversity in this region. The study includes an analysis of species richness at the level of political units (municipalities), vegetation types, and grid cells of 10 × 10 km. Additionally, the corrected weighted endemism index was calculated using the grid cells. The sites with the richest taxa are located in the mountain areas; however, these do not coincide with the sites with the highest index of endemism since a high percentage of taxa have a restricted distribution to one of the proposed units. Thirty-six taxa are recognized with restricted distribution to the boundaries of Comarca Lagunera, most of them considered as microendemics, which have been described in recent years. Therefore, it is necessary to establish biodiversity conservation programs in the region since much of Comarca Lagunera territory is dedicated to agricultural and industrial activities.

**Keywords:** biodiversity informatics, conservation, Coahuila, corrected weight endemism index, Durango, north of Mexico, chorological analysis, semiarid vegetation

## 1. Introduction

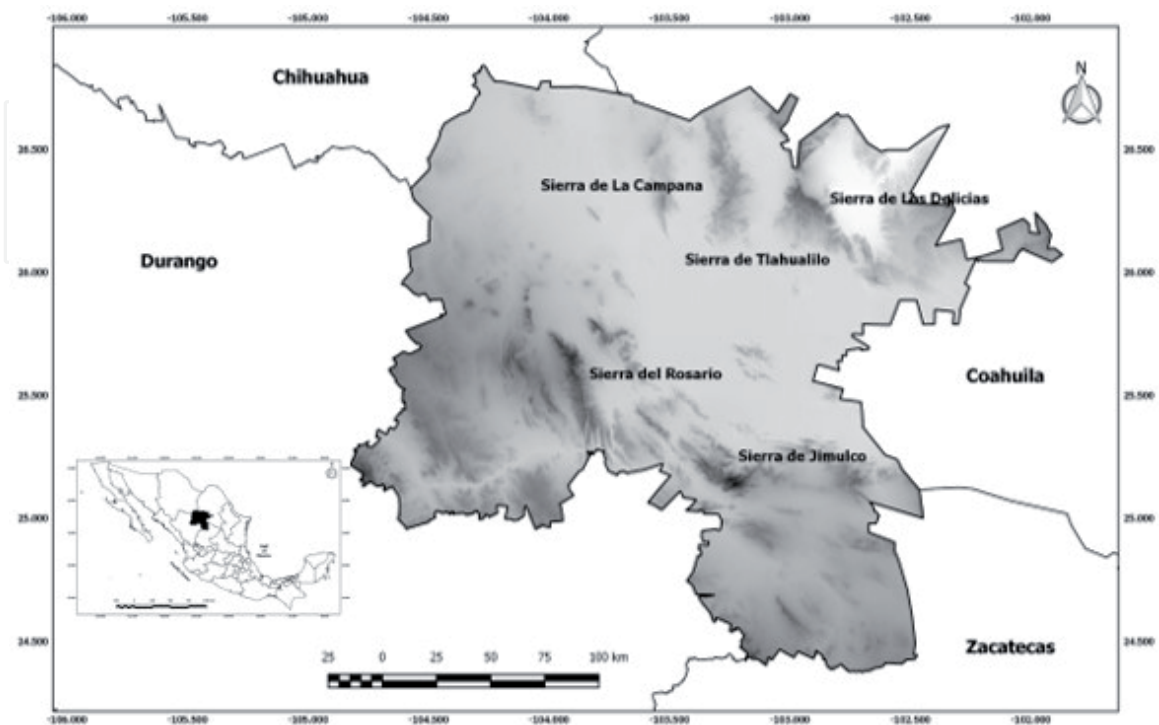
Biodiversity informatics is a set of tools that allows free and rapid access to knowledge accumulated in different sources and media such as biological collections and specialized literature, which has facilitated the arrangement, management, analysis, and interpretation of biodiversity in addition to the generation of models; many of them focused on the conservation of biodiversity [1, 2]. The increase in knowledge of biodiversity is seen in a large amount of information from different databases available on the Internet, of which the Global Biodiversity Information Facility (GBIF–[www.gbif.org](http://www.gbif.org)) stands out, housing more than 1000 million records of species distribution (October 2018). This number of records continues growing, as

it improves the quality control of the data hosted because more and more institutions deposit their data on that platform. Another tool that is very useful in biodiversity informatics is the Biodiversity Heritage Library (BHL—[www.biodiversitylibrary.org](http://www.biodiversitylibrary.org)), which allows free access to millions of published historical documents related to taxonomy, biogeography, and ecological aspects of the groups that form the biodiversity, among other items; thanks to these platforms, it is now easier to consult information that in the past was difficult to access for many research groups.

In Mexico, the National Commission for Knowledge and Use of Biodiversity (CONABIO) carried out one of the first attempts to gather and make available information to researchers about the distribution of Mexican species. Currently, the National System of Information on Biodiversity (SNIB) is one of the most reliable databases that houses information on the distribution of a large number of species of virtually all biological groups known to Mexico; this database gathers information from a large number of Mexican collections in which the taxonomic information has been reviewed, identified, and determined by specialists, and it also has a high level of quality in the revision phase of the georeferencing of the localities of distribution, so its reliability is very high [3]. The effort made by different institutions to learn about biodiversity allows Mexico to contribute to one of the objectives of the Systematic Agenda [4].

Although Mexico has a great botanical tradition and the knowledge of the flora in several regions is relatively well known, such as the north of the country and mainly the Chihuahuan Desert [5, 6], there are areas that do not still have an inventory of their flora, and therefore the distribution of the endemic elements is unknown, which is an impediment to carry out conservation plans. One of the regions in which a complete inventory of the flora is not yet made is Comarca Lagunera, a region located in the northern center of Mexico, within the Chihuahuan Desert (**Figure 1**).

The boundaries of Comarca Lagunera differ depending on the approach considered, and in this chapter, the limits proposed by Sánchez [7] are taken, which recognize that Comarca Lagunera is composed of 15 municipalities that share particular natural and socioeconomic attributes. Five of these municipalities belong to the state of Coahuila (Francisco I. Madero, Matamoros, San Pedro, Torreón, and Viesca) and



**Figure 1.**  
*Localization of Comarca Lagunera in México and its principal mountain zones.*

10 to the state of Durango (General Simón Bolívar, Gómez Palacio, Lerdo, Mapimí, Nazas, Rodeo, San Juan de Guadalupe, San Luis del Cordero, San Pedro del Gallo, and Tlahualilo) (**Figure 2**). Under these limits, Comarca Lagunera covers an area of just over 43,000 km<sup>2</sup>, which is equivalent to the total territory of Denmark.

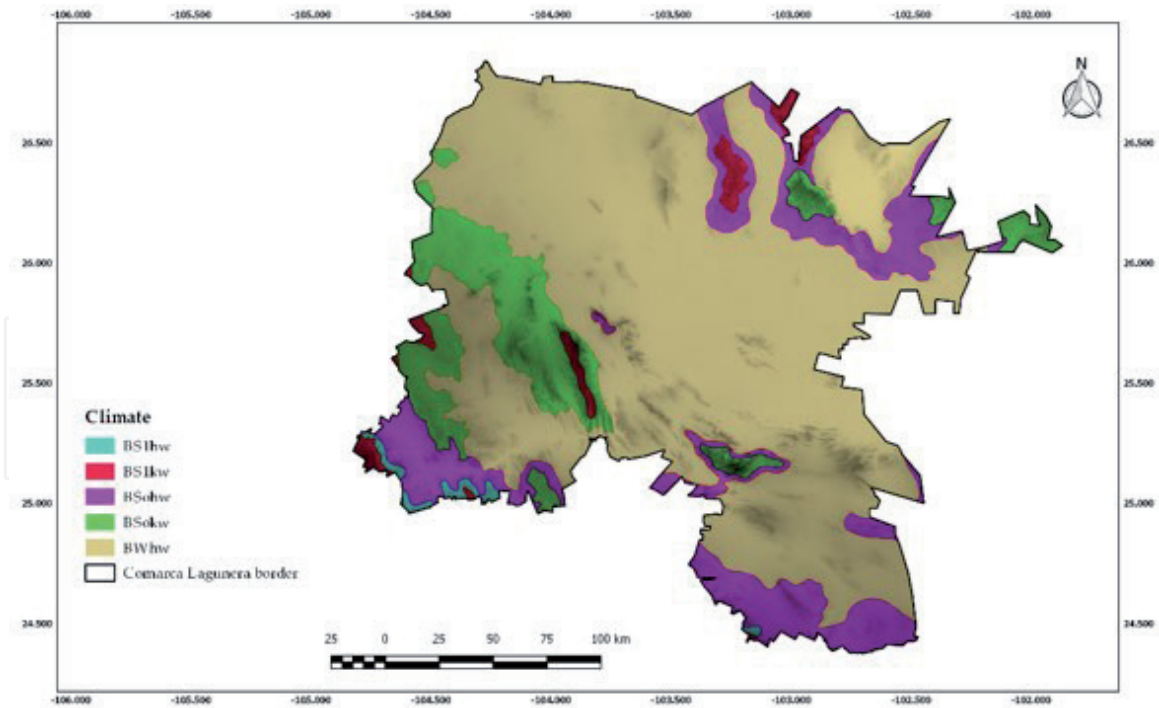
The climate of Comarca Lagunera is semiarid to very arid, according to García [8] (**Figure 3**), with an average annual temperature of 20–22°C and an annual rainfall of 200–300 mm. The climate types are BS1hw (semiarid-semiwarm), BS1kw (semiarid-tempered), BS0hw (arid-semiwarm), BS0kw (arid-tempered), and BWhw (arid-semiwarm). The relief of the region is composed of small hills and low elevations, as well as adjacent depressions [9], among the main elevations are the mountains of Candelaria, El Rosario, El Sarnoso, España, Jimulco, La Campana, Las Cadenas, Las Delicias, Mapimí, and Tlahualilo.

Mexico has a richness flora and vegetation as a result of the great diversity of ecological conditions, which in turn has been shaped by the complex geological history of its territory. The different types of vegetation that are recognized are based on ecological, floristic, and physiognomic affinities; although some consider the edaphological, geological, and topographic aspects of greater importance [10]. The different vegetation types according to the National Institute of Statistic and Geography (INEGI) are based on [11, 12]. The land use and vegetation information elaborated by the INEGI is a reliable element in terms of information and its feasibility; therefore, they are used as a basic framework by government agencies, the private sector, and academia, and it is a basic input for the implementation of institutional programs as a reference for the preparation of reports on the state of plant cover in Mexico [13]. The diversity of types of vegetation in Mexico is so wide that it is difficult to find an equivalence with those that exist in other places [14], including those of North America in northern Mexico [15].



**Figure 2.**  
*Municipalities that form Comarca Lagunera, according to Sánchez [7].*

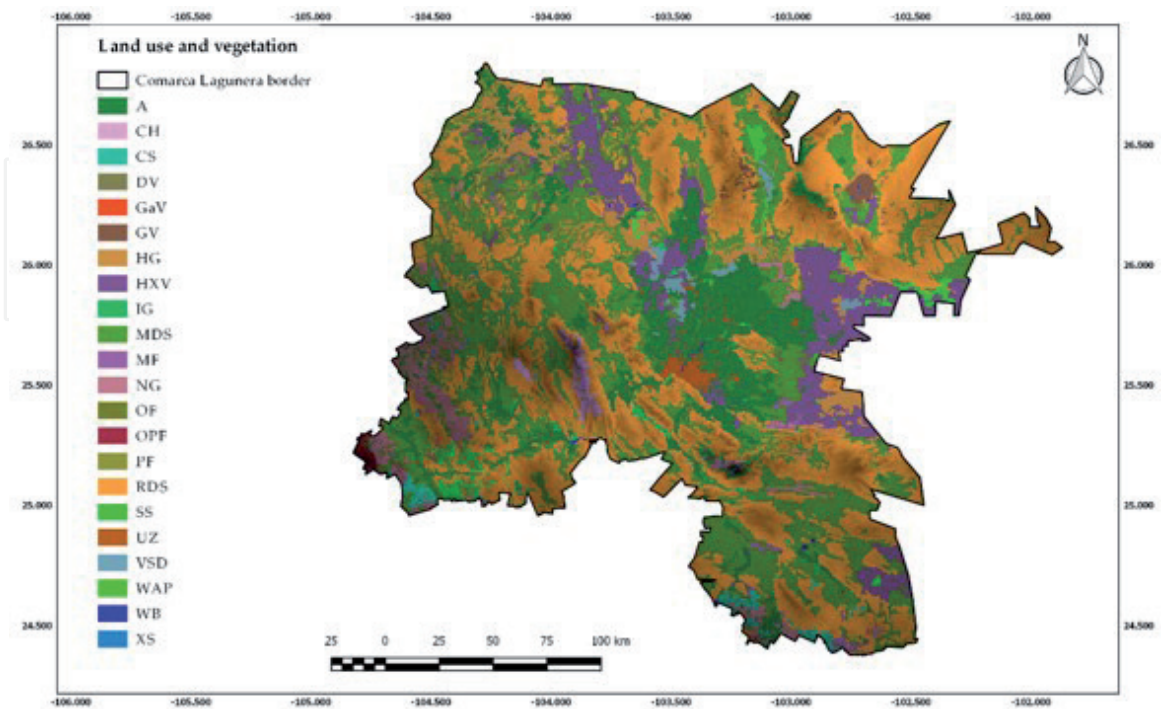




**Figure 3.**  
 Climates in Comarca Lagunera according to García [8].

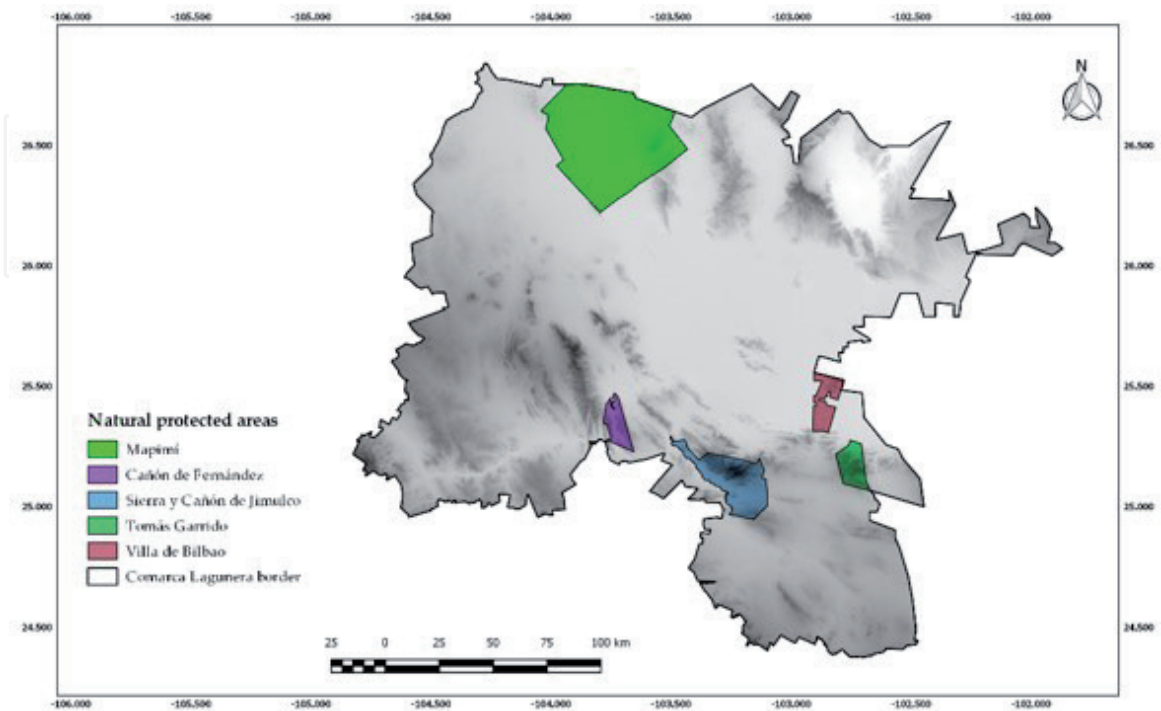
According to the National Institute of Statistic and Geography (INEGI) [13], the land use and vegetation types in the area are 17. The description of the types of vegetation exceeds the objective of this work so only listed below, in parentheses are the most important genera that are present in each of them: chaparral (*Arctostaphylos* Adans., *Ceanothus* L., *Cercocarpus* Kunth, *Eriogonum* Michx., *Heteromeles* M. Roem., *Mimulus* L., *Quercus* L., *Rhamnus* L., and *Yucca* L.), crasicaule scrub (*Acacia* Mill., *Brickellia* Elliot, *Buddleja* L., *Celtis* L., *Dalea* Juss., *Larrea* Cav., *Mimosa* L., *Opuntia* Mill., *Prosopis* Burkart, *Rhus* L., *Stenocereus* (A. Berger) Riccob., and *Yucca*), gallery vegetation (*Acacia*, *Chilopsis* Don, *Mimosa*, *Prosopis*, *Salix* L., and *Senecio* L.), gypsophile vegetation (*Dicranocarpus* A. Gray, *Flaveria* Juss., *Helianthemum* Mill., *Petalonyx* A. Gray, *Sartwellia* A. Gray, *Selinocarpus* A. Gray, and *Stipa* L.), halophile grassland (*Distichlis* Raf., *Hilaria* Kunth, *Spartina* Schreb. ex Gmel., *Sporobolus* R.Br., and *Uniola* L.), halophile xerophile vegetation (*Atriplex* L., *Batis* L., *Frankenia* L., *Spartina*, and *Zostera* L.), induced grassland (*Andropogon* L., *Aristida* L., *Bouteloua* Lag., *Bromus* L., *Buchloe* Engelm., *Calamagrostis* Adans., *Cathestecum* C. Presl, *Deschampsia* P. Beauv., *Erioneuron* Nash, *Festuca* L., *Hilaria*, *Lycurus* Kunth, *Muhlenbergia* Schreb. ex Gmel., *Stipa*, *Trachypogon* Nees, and *Trisetum* Pers.), microphile desertic scrub (*Acacia*, *Cercidium* Tul., *Condalia* Cav., *Chilopsis*, *Flourensia* DC., *Fouquieria* Kunth, *Hymenoclea* Torr. & A. Gray, *Larrea*, *Lycium* L., *Olneya* A. Gray, *Opuntia*, and *Prosopis*), mesquite forest (*Prosopis*), natural grassland (*Bouteloua*), oak forest (*Quercus*), oak-pine forest (*Quercus*, *Pinus* L.), pine forest (*Pinus*), rosetophile desertic scrub (*Agave* L., *Dasyllirion* Zucc., *Euphorbia* L., *Hechtia* Klotzsch, *Parthenium* L., and *Yucca*), sub-montane scrub (*Acacia*, *Agave*, *Aristida*, *Bouteloua*, *Capparis* L., *Cordia* L., *Euphorbia*, *Flourensia*, *Gochnatia* Kunth, *Karwinskia* Zucc., *Leucophyllum* Humb. & Bonpl., *Mimosa*, *Mortonia* A. Gray, *Neopringlea* S. Watson, *Pithecellobium* Mart., *Rhus*, *Tridens* Roem. & Schult, and *Zanthoxylum* L.), vegetation of sandy desert (*Ambrosia* L., *Atriplex*, *Ephedra* L., *Larrea*, *Opuntia*, *Prosopis*, and *Yucca*), and xerophile scrub (*Acacia*, *Agave*, *Dasyllirion*, *Euphorbia*, *Flourensia*, *Fouquieria*, *Larrea*, *Opuntia*, *Prosopis*, and *Yucca*). A considerable part of the territory of the region is occupied for agricultural and livestock activities (Figure 4).

Within the territory of Comarca Lagunera, five areas have been decreed for the protection of biodiversity: a protected natural area at the federal level (Reserva de la Biósfera Mapimí), one at the state level (Parque Estatal Cañón de Fernández), one



**Figure 4.**

*Land use and vegetation types in Comarca Lagunera according to INEGI [10]. A = agricultural; CH = chaparral; CS = crasicaule scrub; DV = depleted of vegetation; GaV = gallery vegetation; GV = gypsophile vegetation; HG = halophile grassland; HXV = halophile xerophile vegetation; IG = induced grassland; MDS = microphile desertic scrub; MF = Mesquite forest; NG = natural grassland; OF = Oak forest; OPF = Oak-pine forest; PF = Pine forest; RDS = rosetophile desertic scrub; SS = submontane scrub; UZ = urban zones; VSD = vegetation of sandy desert; WAP = without apparent vegetation; WB = water body; and XS = xerophile scrub.*



**Figure 5.**

*Protected natural areas decreed in Comarca Lagunera.*

municipal (Sierra de Jimulco), and two at ejidal level (Dunas de Bilbao and Ejido Tomás Garrido) (**Figure 5**).

The objective of the present study is to analyze the distribution and abundance of the taxa of the endemic flora of Mexico distributed in Comarca Lagunera in order to recognize potential sites for their conservation.

## 2. Methods

The search for information regarding the distribution of vascular plants in the SNIB database was carried out, where the records of the collected specimens in Comarca Lagunera were compiled. Considering the political limits of the 15 municipalities that form this region of Mexico, an exhaustive literature search was conducted in the BHL to detect nonregistered taxa, as well as verify the distribution of the taxa and addition of sites of collection not reported in the SNIB databases.

The information of the protologue of most of the taxa was reviewed, mainly those that have been described as new in the last decades, as well as the sites of register of collection of these taxa. The information published in various inventories at the state or regional level for both the flora as a whole or for specific groups was also consulted [6, 16–26], in addition to the review of the specimens deposited in the Interdisciplinary Research Center for Regional Integral Development (CIIDIR) herbarium.

Based on the information collected, a database with the records of the different taxa distributed in the boundaries of Comarca Lagunera was constructed. The nomenclatural information to avoid synonyms was based on the consultation of databases on the Internet of the International Plant Name Index (IPNI) (<https://www.ipni.org>), The Plant List (<http://www.theplantlist.org>), Tropicos (<http://www.tropicos.org>), and mainly in Villaseñor [27], which is so far the work that brings together the most extensive knowledge about the distribution of the flora of Mexico, where the author mentions that there are about 23,314 species and 1,414 subspecific categories.

In this study, the classification used by Villaseñor [27] for higher taxonomic categories is followed, which is based in turn mainly on the classification of Angiosperm Phylogeny Group [28]. The constructed database was refined to identify duplicate records and errors in the georeferencing. The records without geographic reference or with errors in it were georeferenced with the help of the topographic charts of INEGI scale 1:250,000 and 1:50,000 ([www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx)). For maps elaboration, the digital model of the continuum of Mexican elevations (<http://www.beta.inegi.org.mx/app/geo2/elevacionesmex>) was used, in addition to the cartography related to land use and vegetation types for the region [13] and natural protected areas at the federal [29], state, municipal, and ejidal level [30]. All maps were created in the software QGIS 2.18.23 [31].

In order to perform the chorological analysis, the following were used as Operational Geographical Units (OGUs): the municipalities that are part of Comarca Lagunera, vegetation types, and a grid cell of 10 × 10 km latitude/longitude. Species richness was measured as the total count of species within each of the proposed units. In the analyzes at the municipal level, the criteria suggested by Dávila-Aranda et al. [32], with modifications due to the number of municipalities of Comarca Lagunera, to classify the level of restriction in the distribution of the species in scarcely distributed (taxa registered only in one municipality), closely distributed (2–4 municipalities), normally distributed (5–7 municipalities), and widely distributed (8 or more municipalities) were employed. Using these study units, a species accumulation curve was constructed, and with the aid of the nonparametric Chao2 estimator, the approximate number of endemic taxa, which are still unknown in Comarca Lagunera, was determined.



The vegetation types recognized by INEGI [13] for Comarca Lagunera were used; in each type of vegetation, the contribution of the endemic species of Mexico was evaluated. The information of the presence records was used to perform a cluster analysis, for which an absence-presence matrix was constructed to carry out a similarity analysis applying the Jaccard index, which was preferred over other indexes due to the fact that it does not consider shared absences. Once the similarity matrix was obtained, a grouping analysis (UPGMA) was carried out, to determine the floristic similarity among vegetation types. The corresponding phenogram was generated with the average linkage or UPGMA using the SAHN-clustering command in the NTSYSpc version 2.0 program [33].

Since the municipality size of Comarca Lagunera is not uniform and the area occupied by the different vegetation types is extremely different, it was necessary to carry out an alternative chorological analysis with units of standardized size. For this reason, a grid cell of 10 km per side was constructed to reduce the effect of the differences in the size of the units used for the analysis according to Crisp et al. [34]. An analysis of richness and endemism was also carried out following the proposal of Crisp et al. [34] and Linder [35], and this analysis called corrected weighted endemism index (CWEI) was applied for the first time to analyze the endemic elements of the flora of Australia and later in Africa. In Mexico, it has been applied in the analysis of diverse groups of flora and fauna, mainly to detect species-rich sites and a high level of endemism in order to propose sites for the conservation of biodiversity [36–39].

The CWEI [34, 35] is a methodology that calculates the relationship of taxa richness with weighted endemism. For this index, the presence of the taxon in an OGU is considered, and the abundance is omitted. It consists of three basic steps: in the first one, the index of endemism is calculated for each one of the taxa which is the result of the amplitude of its distribution, so it is calculated as the reciprocal of its distribution, and therefore, a species with restricted distribution to a single OGU (in this case grid cells) is assigned an index of “1,” a species that is distributed in two OGUs is assigned an index of “0.5,” and so on in such a way that the index will be lower as its distribution increases, so it is weighted with a higher value for species with restricted distribution; the second step is to calculate the weighted endemic index (WEI) for each of the OGUs, this is achieved by summing the values of the endemism index of each of the taxa that are distributed in each OGU; while the third step consists in dividing the WEI by each one of the OGUs among the richness of species that are distributed in it, in this way, we obtain the CWEI for each one of the OGUs; OGUs with the highest scores are recognized as centers of endemism.

Finally, a complementarity analysis was carried out [40] to detect the minimum number of grid cells needed to conserve most of the endemic species that inhabit this area of Chihuahuan Desert. The method consists in selecting the areas to be protected based on the total species richness from the following procedure: the grid cell with the highest number of taxa is selected, this is the grid cell with priority 1, the species registered in it are eliminated from the analysis, and then the selection of the grid cell with the highest number of remaining taxa (complement) that have not yet been selected in the previous step is repeated; if two or more grid cells have the same number of taxa, the first grid cell identified is selected, and the procedure ends when all the taxa have been selected.

### 3. Results and discussion

The richness of endemic plants of Mexico represented in Comarca Lagunera consists of 59 families, 184 genera, 300 species, and 21 infraspecific taxa (8 subspecies and 13 varieties) totaling 321 taxa (**Table 1**). Thirty-six taxa possess known

distribution only for the area corresponding to Comarca Lagunera (Appendix), 21 more taxa are known only from the Chihuahuan Desert (*sensu* Villarreal-Quintanilla et al. [41]), 33 more taxa only occur in the states of Coahuila and Durango, and the rest of the taxa is restricted to the territory of Mexico but with a greatly wide distribution. This diversity of endemic taxa corresponds to approximately 10% of the total endemic species of Mexico [27] and to about 30% of the flora known for Comarca Lagunera [González-Zamora & Pérez-Morales, *in prep.*].

The families with the highest number of endemic taxa in Mexico distributed in Comarca Lagunera are Asteraceae and Cactaceae, which collectively account for approximately 35% of the total, this percentage is consistent with the results of Villarreal-Quintanilla et al. [41] for the endemic flora of the Chihuahuan Desert, as well as for other semi-desert regions of central Mexico. The first six families with the highest number of endemic taxa represent about 54% of those reported for this region of Mexico and 36% of the taxa restricted to Comarca Lagunera (**Table 2**).

Of the 10 genera with 5 or more endemic species of Mexico, 4 correspond to the family Cactaceae, 2 to Asteraceae, 1 to Lamiaceae, 1 to Asparagaceae, 1 to Caryophyllaceae, and 1 to Fabaceae (**Table 3**). *Corynopuntia* F.M. Knuth and *Gaillardia* Foug. are the best represented genera; since in the study area, five of the seven species and five of the six species reported as endemic to Mexico, respectively, are distributed, including *Corynopuntia halophila* D. Donati which until now has only been reported as restricted to the territory of Comarca Lagunera [42], the same case is presented for *Salvia jessicae* B.L. Turner [43] and *Drymaria jenniferae* Villarreal & A.E. Estrada [44].

In the distribution by political entities, it was found that in general terms, the municipalities corresponding to the state of Coahuila have greater richness

Taxonomic group	Families	Genera	Species	Infraspecific taxa
Ferns	2	3	3	
Gymnosperms	1	1	1	
Angiosperms	56	180	296	21
Monocots	6	18	30	1
Eudicots	50	162	266	20
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>184</b>	<b>300</b>	<b>21</b>

**Table 1.**  
Number of taxa of endemic vascular plants of Mexico in Comarca Lagunera.

Family	Taxa	Percentage with respect to the total	Genera represented	Endemic taxa of Comarca Lagunera
Asteraceae	69	21.5	38	6
Cactaceae	43	13.4	15	2
Fabaceae	27	8.4	16	3
Asparagaceae	13	4.0	7	1
Poaceae	10	3.1	6	
Lamiaceae	10	3.1	2	1
<b>Total</b>	<b>172</b>	<b>53.5</b>	<b>84</b>	<b>13</b>

**Table 2.**  
Families with the highest number of endemic taxa of Mexico in Comarca Lagunera.



Genus (Family)	Species in Mexico	Species endemics of Mexico	Endemic taxa of Mexico in Comarca Lagunera
<i>Coryphantha</i> (Engelm.) Lem. (Cactaceae)	46	37	8
<i>Mammillaria</i> Torr. & A. Gray (Cactaceae)	169	145	8
<i>Salvia</i> L. (Lamiaceae)	328	258	8
<i>Agave</i> L. (Asparagaceae)	159	133	5
<i>Brickellia</i> Elliott (Asteraceae)	85	57	5
<i>Gaillardia</i> Foug. (Asteraceae)	12	6	5
<i>Corynopuntia</i> F.M. Knuth (Cactaceae)	10	7	5
<i>Opuntia</i> Mill. (Cactaceae)	91	62	5
<i>Drymaria</i> Willd. ex Schult. (Caryophyllaceae)	38	23	5
<i>Dalea</i> Ulbr. (Fabaceae)	146	92	5

**Table 3.**  
 Genus with the highest number of endemic taxa in Mexico with distribution in Comarca Lagunera.

compared to those of Durango. Torreón concentrates the highest number of taxa with 105 (32.7%), followed by Lerdo with 93 (29.0%) (Table 4). This may be due, in the first place, to the fact that the mountainous chains with greater extension and higher altitude are located mainly in these municipalities, which is conducive to the development of a large amount of endemism, as has been documented for other mountainous areas of Mexico in which the conditions of humidity and temperature allow the development of temperate vegetation [45–47], as well as in the Chihuahuan Desert [41] which shows that the diversity in this area of the country is not distributed homogeneously; and second, that the efforts to carry out floristic inventories in the semiarid zones of Coahuila have been greater; however, in the part corresponding to Durango, several inventories are in the process of being elaborated that will undoubtedly increase the knowledge of the flora.

For Comarca Lagunera, 175 taxa are recognized as scarcely distributed, that is, their representation is restricted to a single municipality, this corresponds to more than 54%, while only five taxa (1.6%) are registered in seven municipalities or more of the municipalities (Table 5), the above shows what in other studies has been mentioned as the arid and semiarid zones of Mexico have a high proportion of taxa with very restricted distribution [26, 48]; that in this case can be attributed possibly to the geological changes that have occurred in the Chihuahuan Desert and that have been apparently stabilized since the Miocene (15 million years) [49], so that it could be about neo-endemic taxa in the process of expansion of their populations.

In this case, 20 of the 36 taxa recognized as endemic to Comarca Lagunera are scarcely distributed (Appendix), highlighting the case of *Henricksonia mexicana* Turner, which is the only known species of the genus so far, which means that so far *Henricksonia* Turner is the only endemic genus of the flora of Comarca Lagunera. The

State/municipality	Number of taxa	Percentage with respect to the total	State/municipality	Number of taxa	Percentage with respect to the total
<b>Durango</b>	163	50.8	<b>Coahuila</b>	243	75.7
Lerdo	93	29.0	Torreón	105	32.7
Mapimí	57	17.8	San Pedro	87	27.1
Tlahualilo	46	14.3	Viesca	76	23.7
Rodeo	48	14.9	Francisco I. Madero	60	18.7
Nazas	18	5.60	Matamoros	18	5.6
San Pedro del Gallo	18	5.6			
General Simón Bolívar	15	4.7			
San Juan de Guadalupe	13	4.0			
Gómez Palacio	10	3.1			
San Luis del Cordero	4	1.2			

**Table 4.**  
Number of endemic taxa of Mexico and their distribution by municipality in Comarca Lagunera.

Status	Number of taxa	Percentage
Scarcely distributed	175	54.5
Closely distributed	119	37.1
Normally distributed	22	6.9
Widely distributed	5	1.6

**Table 5.**  
Frequency of endemic taxa of Mexico according to their distribution in the municipalities of Comarca Lagunera.

restricted distribution of the mentioned taxa means that the populations have a very small number of individuals, and therefore, it is necessary to make a greater collection effort to locate them in other places, as well as ecological studies that allow to properly characterize these populations, which will allow to have solid elements for their possible inclusion within NOM-059-ECOL-2010 [50], which is the official list in Mexico for the species that present some degree of vulnerability. Until this moment not a single taxon of the 36 taxa registered as restricted to Comarca Lagunera is included in the official list NOM-059-ECOL-2010, so it is of great importance to carry out actions that allow its conservation in the face of the increase in surface occupied for anthropogenic activities.

*Coryphantha durangensis* (Runge ex K. Schum.) Britton & Rose is the taxon with the widest distribution since up to now it has been registered in nine municipalities; its distribution slightly exceeds the area of Comarca Lagunera so it can be considered as quasiendemic of the region; this species is listed in NOM-059-ECOL-2010 in the status of subject to special protection (Pr), that is, “that could be threatened by factors that negatively affect its viability, which is why the need to promote its recovery and conservation is determined, or the recovery and conservation of populations of associated species,” likewise this species appears in the red list of the International Union for the Conservation of Nature (IUCN) in the category of Least Concern (LC) [51]. Another 23 taxa are listed in NOM-059-ECOL-2010 and 36 taxa in the red lists

of the IUCN (**Table 6**) among which *Echinocereus mapimiensis* E.F. Anderson, W. Hodgs. & P. Quirk is the only taxon restricted to the region that is included in the IUCN in the category of vulnerable (VU) [52]; *Turbinicarpus mandragora* (Fric ex A. Berger) A.D. Zimmerman and *Mammillaria pennispinosa* Krainz stand out and are distributed in Coahuila and Durango, respectively, and which according to the IUCN are in the category of critically endangered (CR) [53, 54].

The curve of accumulation of species (**Figure 6**) and the nonparametric estimator of Chao2 calculated show that the richness of endemic taxa of Mexico present in Comarca Lagunera is well known, since the result of the Chao2 estimator indicates that it is necessary to locate only eight taxa, and these data agree with the results of González-Elizondo et al. [5] for the flora of northern Mexico who mention that the flora of this region is practically well known and there are few species to be discovered; however, this value should be considered with caution since there are several sites, mainly those located in the higher mountain areas where access is complicated, in addition to the riparian zones that have not yet been documented. Likewise, the knowledge of the taxa with restricted distribution to the limits of Comarca Lagunera used in the present study has increased in the last 10 years in which 8 out of the 36 endemic taxa have been described (Appendix).

Among the vegetation types where the endemic taxa are distributed, the rose-tophile desert scrub stands out, in which 192 taxa are distributed, followed by the microphile desert scrub with 147 and chaparral with 76 (**Table 7**). Furthermore, a considerable number of taxa (81) are in what has been classified as agricultural areas, so the risk of losing this part of biodiversity is considerably high; however, many of these areas have been abandoned due to the decrease in the sale prices of some products, the lack of water, the advance of desertification, and among other factors [55]. Although due to the high technology use for agriculture and the opening of sites for the breeding of various types of livestock, it cannot be ruled out that some time they are enabled again for this type of activities. A similar situation occurs in the areas that have been classified as urban in which the presence of 45 taxa has been registered, most of these localities do not present a high population density; however, the opening of new industries mainly those dedicated to mining and food production promotes the change of land use, which puts the conservation of the region's biodiversity at risk [56].

In the phenogram obtained from the cluster analysis, from the similarity matrix, three groups can be observed (**Figure 7**). In the first group appear the desert scrubs, both microphile and rosetophile, together with the chaparral and the submontane scrub, the second group is formed by the crasicaule scrub and the natural grassland, while the third group is formed by the halophile grassland, gypsophile vegetation, halophile xerophile vegetation, and vegetation of sandy deserts. It was found that the values of similarity between the different vegetation types are very low, since the microphile and rosetophile desert scrub, which are the vegetation types with the highest level of similarity, share only 41% of the taxa. The low similarity values obtained mean that the taxa represented in Comarca Lagunera have very marked preferences for the environmental conditions that prevail in each of the sites, that is, the beta diversity is very high for the set of species included in the analysis. In analysis were excluded vegetation of gallery, agricultural areas, and urban zones.

The territory of Comarca Lagunera was divided into 535 grid cells, and of these, 206 grid cells include at least one record. The average number of grid cells occupied by taxa is 3, the median is 2, and the mode is 1 (140 taxa), that is, 43.6% of the taxa have a very small distribution within Comarca Lagunera. The taxa distributed in more grid cells were *Coryphantha durangensis* (21), *Randia pringlei* (S. Watson) A. Gray (20), and *Calanticaria brevifolia* (Greenm.) E.E. Schill. & Panero (18), none of these three species restricts its distribution to Comarca Lagunera.

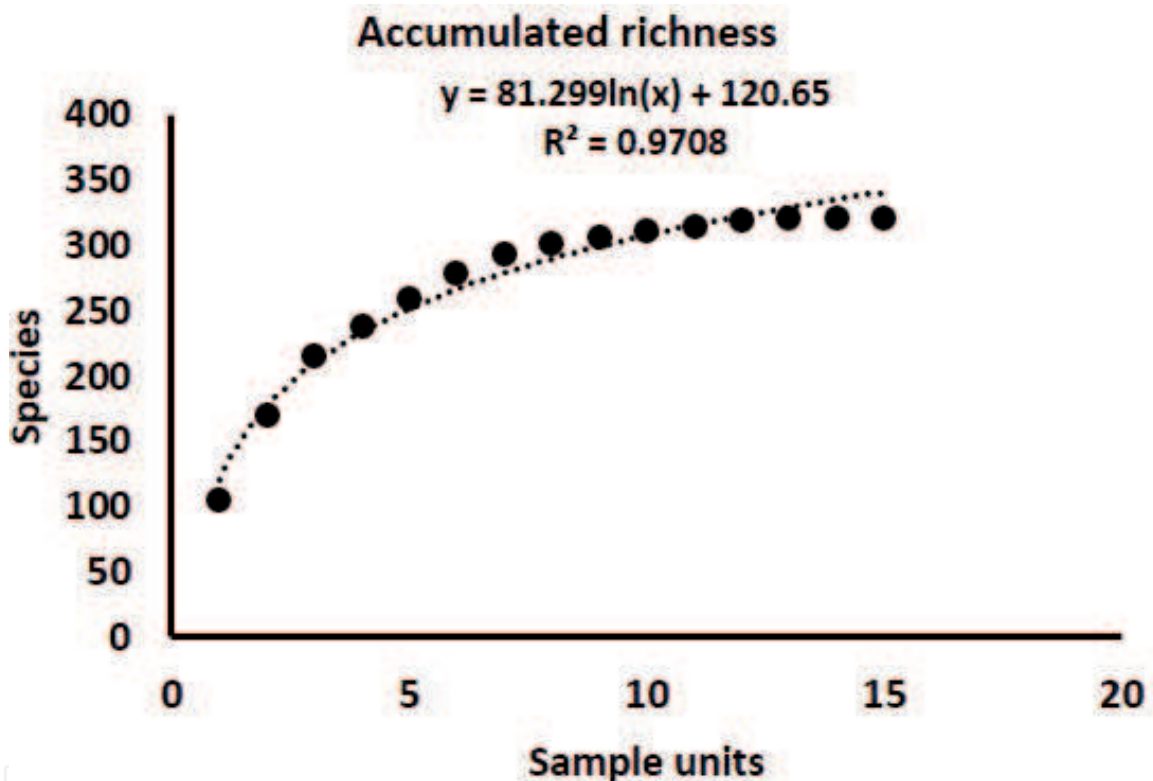
Endemic Species

Taxon	Category IUCN	Category NOM-059-ECOL-2010
<i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore	LC	P
<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i> (Lem.) K. Schum.	NT	Pr
<i>Astrophytum myriostigma</i> Lem.	LC	A
<i>Corynopuntia bulbispina</i> (Engelm.) F.M. Knuth	EN	
<i>Corynopuntia moelleri</i> (A. Berger) F.M. Knuth	LC	
<i>Corynopuntia vilis</i> (Rose) F.M. Knuth	LC	
<i>Coryphantha delaetiana</i> (Quehl) A. Berger	LC	
<i>Coryphantha echinus</i> (Engelm.) Britton & Rose	LC	
<i>Coryphantha poselgeriana</i> (A. Dietr.) Britton & Rose	LC	A
<i>Coryphantha gracilis</i> L. Bremer & A. B. Lau	LC	P
<i>Coryphantha durangensis</i> (Runge ex K. Schum.) Britton & Rose	LC	Pr
<i>Coryphantha longicornis</i> Boed.	LC	
<i>Coryphantha pseudonickelsiae</i> Backeb.	LC	
<i>Cylindropuntia imbricata</i> subsp. <i>cardenche</i> (Griffiths) U. Guzmán	LC	
<i>Cylindropuntia anteojoensis</i> (Pinkava) E.F. Anderson	VU	Pr
<i>Dalea melantha</i> S. Schauer	LC	
<i>Dalea melantha</i> var. <i>pubens</i> Barneby	LC	
<i>Dyssodia pinnata</i> (Cav.) B.L. Rob.	LC	
<i>Echinocereus mapimiensis</i> E.F. Anderson, W. Hodgs. & P. Quirk	VU	
<i>Echinocereus primolanatus</i> A.F. Schwarz ex N.P. Taylor	LC	
<i>Echinocereus stramineus</i> subsp. <i>occidentalis</i> (N.P. Taylor) N.P. Taylor	LC	
<i>Echinomastus unguispinus</i> subsp. <i>durangensis</i> (Runge) U. Guzmán		A
<i>Ephedra compacta</i> Rose	LC	
<i>Ferocactus pilosus</i> (Galeotti ex Salm Dyck) Werderm.	LC	Pr
<i>Fouquieria shrevei</i> I.M. Johnst.		Pr
<i>Grusonia bradtiana</i> (J.M. Coult.) Britton & Rose	LC	
<i>Leuchtenbergia principis</i> Hook.	LC	A
<i>Mammillaria coahuilensis</i> (Boed.) Moran	EN	A
<i>Mammillaria grusonii</i> Runge	LC	Pr
<i>Mammillaria lenta</i> K. Brandegees	LC	A
<i>Mammillaria mercadensis</i> Patoni	LC	Pr
<i>Mammillaria pennispinosa</i> Krainz	CR	Pr
<i>Mammillaria pennispinosa</i> subsp. <i>nazasensis</i> (Glass & R. Foster) D.R. Hunt		Pr
<i>Mammillaria stella-de-tacubaya</i> Heese		Pr
<i>Mammilloidia candida</i> (Scheidw.) Buxb.	LC	
<i>Manfreda brunnea</i> (S. Watson) Rose		A
<i>Manfreda potosina</i> (B.L. Rob. & Greenm.) Rose		Pr
<i>Opuntia leucotricha</i> DC.	LC	
<i>Physalis patula</i> Mill.	LC	



Taxon	Category IUCN	Category NOM-059-ECOL-2010
<i>Quercus vaseyana</i> Buckley	LC	
<i>Thelocactus bicolor</i> subsp. <i>bolaensis</i> (Runge) Doweld		A
<i>Thelocactus heterocromus</i> (F.A.C. Weber) Van Oost		A
<i>Thelocactus rinconensis</i> subsp. <i>nidulans</i> (Quehl) Glass	LC	A
<i>Turbinicarpus mandragora</i> (Fric ex A. Berger) A.D. Zimmerman	CR	A

**Table 6.** Endemic taxa of Mexico with distribution in Comarca Lagunera listed in some risk category. A = Threatened; CR= Critically Endangered; EN= Endangered; LC= Least Concern; NT= Near Threatened; P = In danger of extinction; Pr= Subject to special protection; VU= Vulnerable.



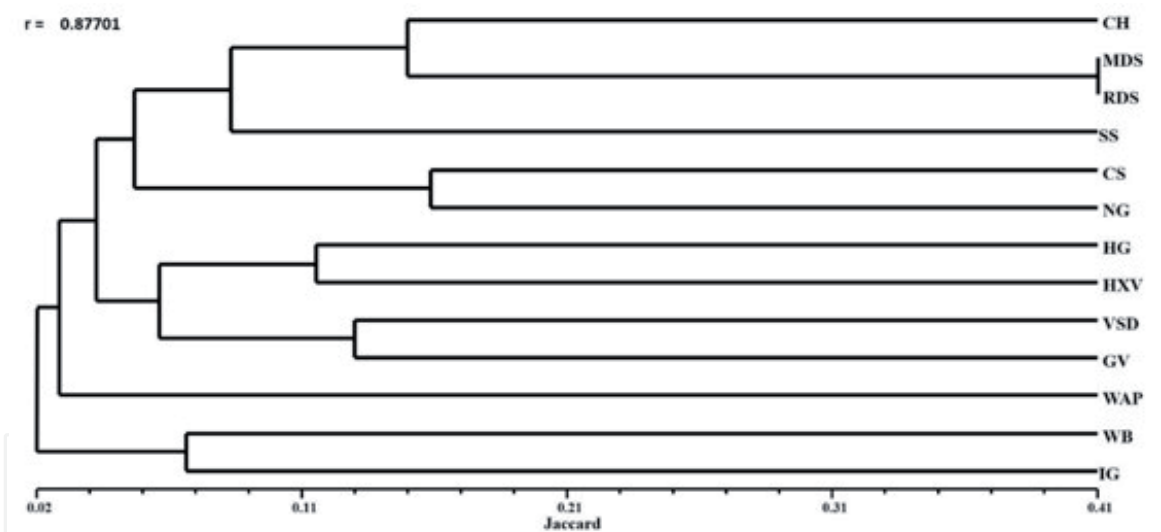
**Figure 6.** Curve of accumulation of endemic taxa of Mexico with distribution in Comarca Lagunera.

The grid cells with the richest taxa were concentrated in some of the most important mountain ranges in the region. In Sierra de Jimulco (Torreón), we found two, one of them with 58 and the other one with 48 taxa, followed by Sierra de Las Delicias (San Pedro) presenting one in which 36 taxa are distributed and Sierra del Rosario (Lerdo) with one containing 31 taxa (**Figure 8**). The results obtained in the analysis of grid cells agree with the analysis at the level of municipalities mentioned above.

The grid cells with the highest WEI scores correspond with the grid cells presenting the highest taxa richness, and this is a consequence of the number of taxa rather than the values of endemism, as suggested by Crisp et al. [34]. However, the grid cells, where the highest values of the CWEI are presented, do not match with the grid cells with the greatest richness, since the highest values occur in places with few taxa. In addition, these grid cells have values of 1 for this index, in fact, there are 14 grid cells with this value, out of which 13 have a single registered taxon, and moreover, these are the only grid cells where those taxa are distributed. *S. jessicae* is the only species with restricted distribution to Comarca Lagunera and that is also

Type of vegetation	Number of taxa
Vegetation of gallery	1
Vegetation associated with bodies of water	5
Without apparent vegetation	5
Vegetation of sandy deserts	8
Induced grassland	10
Crasicale scrub	11
Submontane scrub	19
Halophile grassland	21
Halophile xerophile vegetation	26
Gypsophile vegetation	26
Natural grassland	25
Chaparral	76
Microphile desertic scrub	147
Rosetophile desertic scrub	192

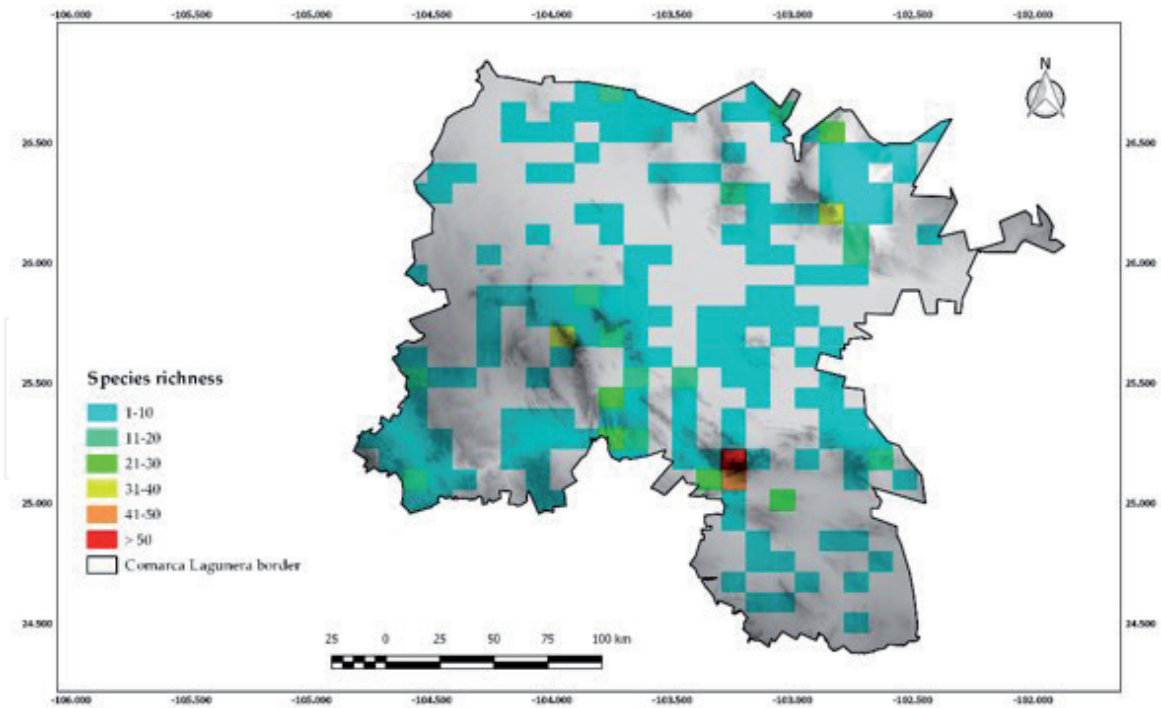
**Table 7.** Distribution of taxa by type of vegetation and land use in Comarca Lagunera according to INEGI (2016).



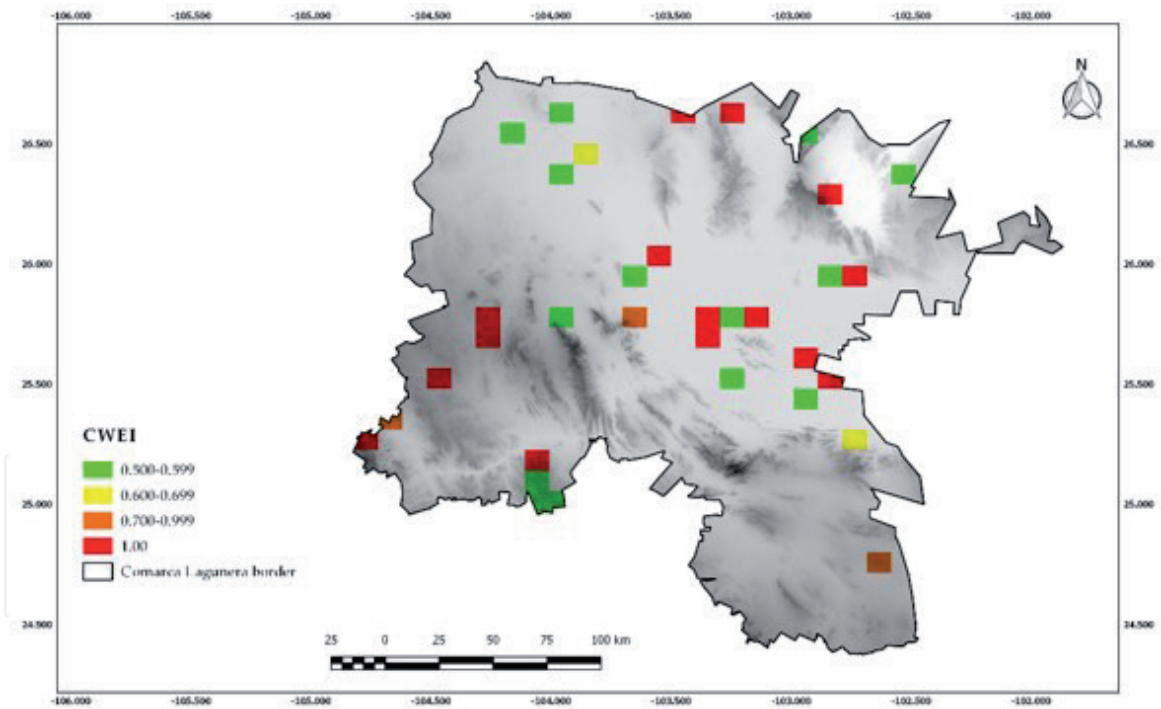
**Figure 7.** Phenogram showing the relationships of the vegetation types in Comarca Lagunera based on the distribution of the endemic taxa of Mexico. CH = chaparral; CS = crasicale scrub; GV = gypsophile vegetation; HG = halophile grassland; HXV = halophile xerophile vegetation; IG = induced grassland; MDS = microphile desert scrub; NG = natural grassland; RDS = rosetophile desert scrub; SS = submontane scrub; VSD = vegetation of sandy deserts; WAP = without apparent vegetation; and WB = vegetation associated with bodies of water.

the only taxon that has been registered in that grid cell, that is, this species can be considered as microendemic of this region of the country. If grid cells with a value of 1 are excluded from the analysis, three grid cells can be identified with a CWEI value of more than 0.750, which is the next highest value; these grid cells are located in sites that have been classified as agricultural (**Figure 9**).

The results obtained in the complementarity analysis show that seven grid cells are required to conserve at least 50% of the endemic flora of Mexico in this region (**Figure 10**); however, because a high percentage of taxa presents a distribution in



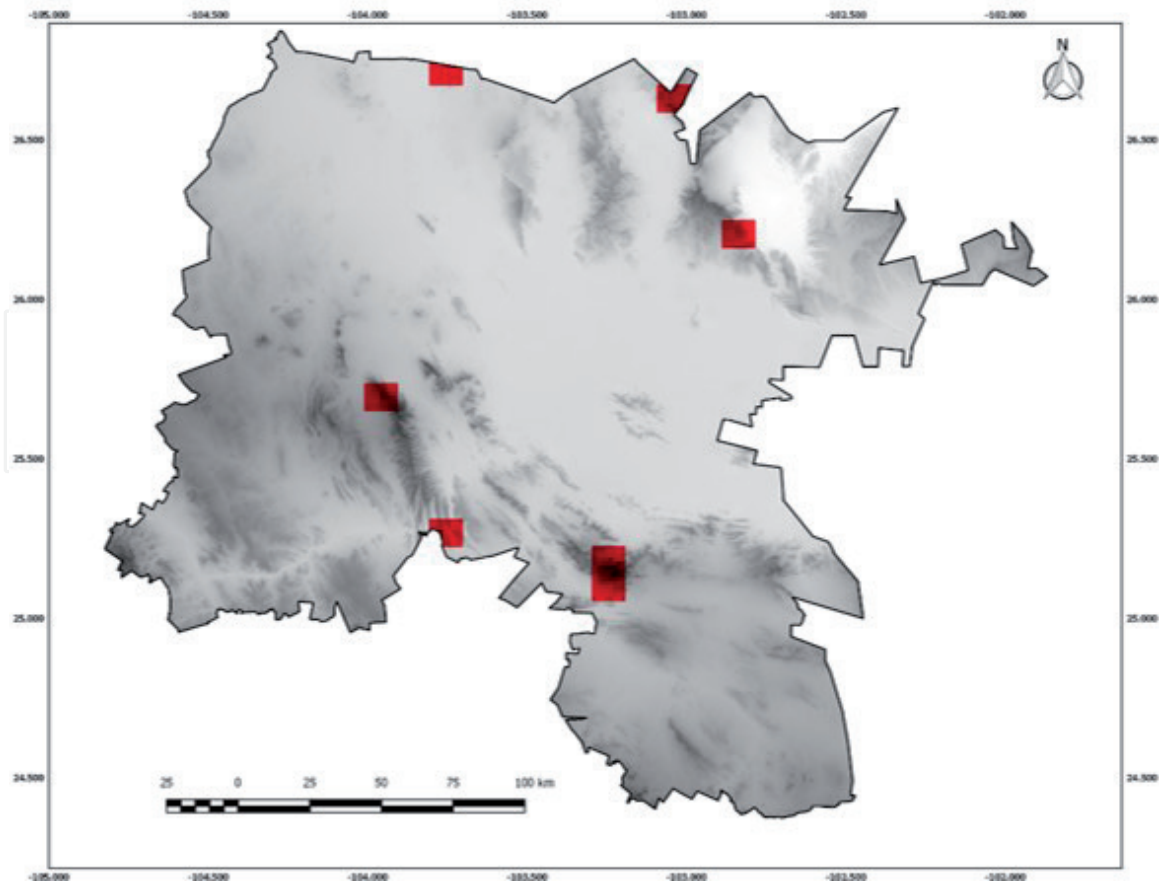
**Figure 8.**  
*Species richness in Comarca Lagunera based on the distribution in grid cells of 10 × 10 km.*



**Figure 9.**  
*Grid cells with the highest values of corrected weighted endemism index.*

only one grid cell, about 90% of them is required to preserve the total of the flora included in this analysis. The previous results show that the conservation strategy that allows the protection of the endemic flora of Mexico represented in this region will be a complicated task due to the economic activities on which Comarca Lagunera depends.

Finally, the data shown here represent a first approach to the knowledge of the endemic flora present in this region of the country, and with a greater collection effort, it would probably increase. It has been reported that the causes of endemism in the



**Figure 10.**  
*Grid cells needed to conserve at least 50% of the flora in Comarca Lagunera.*

arid and semiarid zones of Mexico, mainly in the Chihuahuan Desert, are frequently determined by habitat, as is the case of halophyte and gypsophyte taxa [41] and by geographic isolation mainly in the mountain areas; however, in this case, it seems that this rule is not fulfilled possibly due to the alteration of the habitats that has been caused by the different anthropogenic activities. What is a fact is that the endemic flora registered in Comarca Lagunera differs from the floristic elements found in other sites such as Cuatrociénegas and Parras de la Fuente, two localities near Comarca Lagunera, that present higher humidity and lower temperatures, since many of the known taxa of these last two sites are not represented in Comarca Lagunera [44].

#### 4. Conclusions

The SNIB has allowed access to many researches of Mexican biodiversity in entities where there are no collections or infrastructure to house them, and they can have access to information available in scientific collections that sometimes is not available for various reasons, mainly because it is found in foreign collections, as information that is more and more strictly curated by specialists from several of the main research centers in the country; this represents one of the clearest advances in biodiversity knowledge and the cooperation of several Mexican scientific institutions, a process that began almost 30 years ago with the creation of CONABIO and later with the development of the World Net of Biodiversity Information (REMIB) that set a precedent not only in Mexico but also in various countries. Nowadays, with the development of applications in smart mobile devices such as the Naturalista platform (<https://www.naturalista.mx>), another huge step is taken that will allow us to know even more about the diversity of Mexico.



The present study represents an example of the value of the records of collections available in electronic media as a basis for biodiversity informatics; however, most of the available databases only present the distribution data, but lack the images of copies, so it is still necessary to review the physical specimens deposited in the collections, which have a special value since a thorough review of them and the support of the original descriptions allow the updating of the identities and the appropriate georeferencing of the specimens of a given locality [57].

In Mexico, as in other countries, conservation decisions are made taking into account political borders instead of natural criteria [32]. In this regard, the case of Comarca Lagunera is not an exception. However, in this case, efforts should be made at more local levels due to the area used in agroindustrial activities and mining exploitation. For example, some ejidos are making efforts for conservation from the scheme called payment for environmental services to which several Mexican official institutions, at different levels, contribute funds for the knowledge and subsequent conservation of biodiversity. A specific case in Comarca Lagunera is the ejido Barreal de Guadalupe, Torreón, where this type of action has been carried out successfully for a couple of years, which has impacted on the welfare of the population; however, efforts must be increased to conserve a greater surface of the semidesert zones of the north of Mexico.

## Acknowledgements

We acknowledge Socorro González Elizondo and Martha González Elizondo who facilitated the consultation of specimens in the CIIDIR Herbarium. J. Jesús González Gallegos provided training for the understanding of nomenclature and descriptions in Latin.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Notes/thanks/other declarations

We thank Efraín Ríos Sánchez for critical read of this manuscript, for the search, and obtaining of literature with the descriptions of the species and Eliab Misael González Olvera who did an invaluable job in correcting the style of the English language.

## A. List of endemic taxa of Comarca Lagunera

Taxon	Year of description	Distribution
<b>Monocots</b>		
Order Asparagales		
Family Asparagaceae		
<i>Agave victoriae-reginae</i> subsp. <i>swobodae</i> Halda	2000	General Simón Bolívar, Lerdo, Nazas, San Pedro, Torreón, Viesca

Taxon	Year of description	Distribution
Order Poales		
Family Bromeliaceae		
<i>Hechtia mapimiana</i> López-Ferrari & Espejo	2013	Lerdo
<b>Eudicots</b>		
Order Fabales		
Family Fabaceae		
<i>Coursetia insomniifolia</i> Lavin.	1986	San Pedro
<i>Dalea melantha</i> var. <i>pubens</i> Barneby.	1977	Lerdo, Torreón
<i>Pomaria fruticosa</i> (S. Watson) B.B. Simpson.	1998	Francisco I. Madero, Lerdo, Matamoros, San Pedro, San Pedro del Gallo, Torreón, Viesca
Order Malpighiales		
Family Euphorbiaceae		
<i>Euphorbia cressoides</i> M.C. Johnst.	1975	Torreón
Order Sapindales		
Family Anacardiaceae		
<i>Cotinus chiangii</i> (Young) Rzed. & Calderón.	1999	Lerdo
Order Malvales		
Family Malvaceae		
<i>Batesimalva lobata</i> Villarreal & Fryxell.	1990	Torreón
Order Brassicales		
Family Brassicaceae		
<i>Dryopetalon stenocarpum</i> Al-Shehbaz	2013	Mapimí, Viesca
<i>Nerisyrenia johnstonii</i> J.D. Bacon.	1978	Francisco I. Madero, San Pedro
Order Caryophyllales		
Family Amaranthaceae		
<i>Atriplex monilifera</i> S. Watson.	1874	Matamoros, Tlahualilo, Viesca
Family Polygonaceae		
<i>Eriogonum henricksonii</i> Reveal	1989	San Pedro
Family Caryophyllaceae		
<i>Drymaria elata</i> I.M. Johnst.	1940	Francisco I. Madero, San Pedro
<i>Drymaria jenniferae</i> Villarreal & A.E. Estrada	2008	Viesca
Family Cactaceae		
<i>Corynopuntia halophila</i> D. Donati	2017	Francisco I. Madero, San Pedro
<i>Echinocereus mapimiensis</i> E.F. Anderson, W. Hodgs. & P. Quirk	1998	Tlahualilo
Order Cornales		
Family Loasaceae		

Taxon	Year of description	Distribution
<i>Eucnide durangensis</i> H.J. Thomps. & Powell	1981	Lerdo, Rodeo, Torreón
Order Ericales		
Family Primulaceae		
<i>Samolus dichondrifolius</i> Channell	1958	San Pedro
Order Gentianales		
Family Rubiaceae		
<i>Hedyotis teretifolia</i> (Terrell) G.L. Nesom	1988	Francisco I. Madero, San Pedro
<i>Machaonia pringlei</i> A. Gray	1886	Torreón, Viesca
Family Apocynaceae		
<i>Matelea greggii</i> (Vail) Woodson	1941	Mapimí
Order Boraginales		
Family Boraginaceae		
<i>Lithospermum jimulcense</i> I.M. Johnst.	1952	Torreón, Viesca
Order Solanales		
Family Solanaceae		
<i>Solanum johnstonii</i> M. D. Whalen	1976	Lerdo, Torreón, Viesca
Order Lamiales		
Family Plantaginaceae		
<i>Mabrya coccinea</i> (I.M. Johnst.) Elisens	1985	Francisco I. Madero, Matamoros, San Pedro
Family Scrophulariaceae		
<i>Leucophyllum coahuilensis</i> Henr.	2004	Francisco I. Madero
Family Lamiaceae		
<i>Salvia jessicae</i> B.L. Turner	2013	Francisco I. Madero
Family Acanthaceae		
<i>Justicia decurvata</i> Hilsenb.	1990	Lerdo
<i>Ruellia jimulcensis</i> Villarreal.	1998	Lerdo, Matamoros, Torreón
<i>Siphonoglossa durangensis</i> Henr. & Hilsenb.	1979	Lerdo
<i>Siphonoglossa linearifolia</i> Henr. & Hilsenb.	1979	Lerdo
Order Asterales		
Family Asteraceae		
<i>Haploesthes hintoniana</i> B.L. Turner	2013	Francisco I. Madero
<i>Henricksonia mexicana</i> B.L. Turner	1977	Lerdo, Nazas, Torreón
<i>Flaveria intermedia</i> J.R. Johnst.	1903	Tlahualilo
<i>Gaillardia candelaria</i> B.L. Turner var. <i>candelaria</i>	2007	San Pedro
<i>Gaillardia candelaria</i> var. <i>mikemoorei</i> B.L. Turner	2013	Francisco I. Madero
<i>Marshalljohnstonia gypsophila</i> Henrickson.	1977	San Pedro

IntechOpen

## Author details

Alberto González-Zamora<sup>1\*</sup> and Rebeca Pérez-Morales<sup>2</sup>

1 Laboratory of Evolutionary Biology, Biological Science Faculty, Juárez University of the State of Durango, Gómez Palacio, Durango, Mexico

2 Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Chemical Sciences, Juárez University of the State of Durango, Gómez Palacio, Durango, Mexico

\*Address all correspondence to: agzfc@ujed.mx

## IntechOpen

© 2018 The Author(s). Licensee IntechOpen. This chapter is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. 

## References

- [1] La Salle J, Williams KJ, Moritz C. Biodiversity analysis in the digital era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2016;**371**:20150337. DOI: 10.1098/rstb.2015.0337
- [2] Peterson AT, Ingenloff K. Biodiversity informatics training curriculum, versión 1.2. *Biodiversity Informatics*. 2016;**10**:65-74. DOI: 10.17161/bi.v11i0.5008
- [3] Jiménez R, Koleff P. La informática de la biodiversidad: una herramienta para la toma de decisiones. In: *Capital natural de México, vol IV: capacidades humanas e institucionales*. México: CONABIO; 2016. pp. 143-195
- [4] Daly M, Herendeen PS, Guralnick RP, Westneat MW, McDade L. Systematics Agenda 2020: The misión evolves. *Systematic Biology*. 2012;**61**:549-552. DOI: 10.1093/sysbio/sys044
- [5] González-Elizondo MS, González-Elizondo M, López-Enríquez IL, Tena-Flores JA, González-Gallegos JG, Ruacho-González L, et al. Diagnóstico del conocimiento taxonómico y florístico de las plantas vasculares del norte de México. *Botanical Sciences*. 2017;**95**:760-779. DOI: 10.17129/botsci.1865
- [6] Henrickson J, Johnston MC. *A flora of the Chihuahuan Desert Region*. Los Angeles, USA: Published by J. Henrickson; 2007. p. 1695
- [7] Sánchez Á. Delimitación geográfica. In: López A, Sánchez A, editors. *Comarca Lagunera: procesos regionales en el contexto global*. Primera ed. México: UNAM-Instituto de Geografía; 2010. pp. 15-36
- [8] García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 5th ed. México: UNAM-Instituto de Geografía; 2004. p. 90
- [9] Gabriel J, Pérez JL. Paisajes geográficos naturales. In: López A, Sánchez A, editors. *Comarca Lagunera: procesos regionales en el contexto global*. Primera ed. México: UNAM-Instituto de Geografía; 2010. pp. 75-97
- [10] Challenger A. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: Pasado, presente y futuro. Vol. 847. UNAM-Instituto de Biología: México; 1998
- [11] Miranda F, Hernández E. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 1963;**28**:29-179
- [12] Rzedowski J. *Vegetación de México*. 1st digital ed. México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad; 2006. p. 504
- [13] Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Conjunto de datos vectoriales de Uso de Suelo y Vegetación. Escala 1:250 000. Serie VI (Capa Unión). Primera ed. México: INEGI. 2016. Available from: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> [Accessed: 14-05-2018]
- [14] González F. Las comunidades vegetales de México. In: *Propuesta para la unificación de la clasificación y nomenclatura de la vegetación de México*. 1st ed. México: Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT); 2003. p. 77
- [15] Rivas-Martínez S, Sánchez-Mata S, Costa M. North American boreal and western temperate forest vegetation (syntaxonomical synopsis of the potential natural plant communities of North America, II). *Itinera Geobotánica*. 1999;**12**:5-316
- [16] González-Elizondo M, González-Elizondo MS, Arrieta Y. Listados Florísticos de México. In: *IX Flora de*

Durango. Primera ed. México: UNAM-Instituto de Biología; 1991. p. 167

[17] Villarreal-Quintanilla JA. Listados Florísticos de México. In: XXIII Flora de Coahuila. Primera ed. México: UNAM-Instituto de Biología; 2001. p. 138

[18] García-Arévalo A. Vascular plants of the Mapimí biosphere reserve, Mexico: A checklist. *Sida*. 2002;**20**:798-807

[19] Villarreal-Quintanilla JA, Encina-Domínguez JA. Plantas vasculares endémicas de Coahuila y algunas áreas adyacentes, México. *Acta Botanica Mexicana*. 2005;**70**:1-46

[20] González-Elizondo MR, Galván-Villanueva IL, López-Enriquez L, Reséndiz-Rojas L, MS G-E. Agaves-magueyes, lechuguillas y noas- del Estado de Durango y sus alrededores. Primera ed. México: CIIDIR Instituto Politécnico Nacional-CONABIO; 2009. p. 163

[21] Hernández HM, Gómez-Hinostrosa C. Mapping the cacti of Mexico. *Succulent Plant Research*. 2011;**7**:1-128

[22] Sánchez J, Estrada-Castillón E, Arias S, Muro G, García-Aranda M, García-Morales LJ. Diversidad cactoflorística de la zona árida y semiárida de Durango, México. *Interciencia*. 2014;**39**:794-802

[23] Hernández HM, Gómez-Hinostrosa C. Mapping the cacti of Mexico. Part II Mammillaria. *Succulent Plant Research*. 2015;**9**:1-189

[24] Montelongo-Landeros M, Alba-Ávila JA, Romero-Méndez U, García-De la Peña C. Pteridophytas de las sierras El Sarnoso y Mapimí en Durango, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2015;**86**:448-456. DOI: 10.1016/j.rmb.2015.04.029

[25] Valdés J. Gramíneas de Coahuila. Primera ed. México: CONABIO; 2015. p. 556

[26] González-Elizondo M, González-Elizondo MS, González-Gallegos JG, Tena-Flores JA, López-Enriquez IL, Ruacho-González L, et al. Updated checklist and conservation status of Cactaceae in the state of Durango, Mexico. *Phytotaxa*. 2017;**327**:103-129. DOI: 10.11646/phytotaxa.327.2.1

[27] Villaseñor JL. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2016;**87**: 559-902. DOI: 10.1016/j.rmb.2016.06.017

[28] The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2009;**161**:105-121. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2009.00996.x

[29] SEMARNAT-CONANP. '*182ANP\_Geo\_ITRF08\_Noviembre\_2017*', ed: 2017. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2017 Ciudad de México, México: 2017. Available from: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> [Accessed: 14-05-2018]

[30] CONABIO. *Áreas Naturales Protegidas Estatales, Municipales, Ejidales y Privadas de México* 2015, ed: 1. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Distrito Federal, Tlalpan. 2015. Available from: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/> [Accessed: 14-05-2018]

[31] Team QGIS Development. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project 2018. Available from: <https://www.qgis.org/>

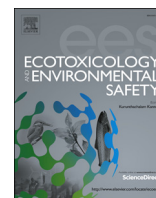
[32] Dávila-Aranda P, Lira R, Valdés-Reyna V. Endemic species of grasses in Mexico: A phytographic approach. *Biodiversity and*



- Conservation. 2004;**13**:1101-1121. DOI: 10.1023/B:BIOC.0000018147.54695.b3
- [33] Rohlf FJ. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Versión 2.0. Exeter Software, Nueva York; 1998
- [34] Crisp MD, Laffan S, Linder HP, Monro A. Endemism in the Australian flora. *Journal of Biogeography*. 2001;**28**:183-198. DOI: 10.1046/j.1365-2699.2001.00524.x
- [35] Linder HP. Plant diversity and endemism in sub-Saharan tropical Africa. *Journal of Biogeography*. 2001;**28**:169-182. DOI: 10.1046/j.1365-2699.2001.00527.x
- [36] Contreras-Medina R, Luna-Vega I. Species richness, endemism and conservation of Mexican gymnosperms. *Biodiversity and Conservation*. 2007;**16**:1803-1821. DOI: 10.1007/s10531-006-9072-3
- [37] Santa Anna Del Conde H, Contreras-Medina R, Luna-Vega I. Biogeographic analysis of endemic cacti of the Sierra Madre oriental, Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2009;**97**:373-389. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2009.01212.x
- [38] Sosa V, de-Nova A. Endemic angiosperm lineages in Mexico: Hotspots for conservation. *Acta Botanica Mexicana*. 2012;**100**:293-315
- [39] Contreras-MacBeath T, Brito M, Sorani V, Goldspink C, McGregor G. Richness and endemism of the freshwater fishes of Mexico. *Journal of Threatened Taxa*. 2014;**6**:5421-5433. DOI: 10.11609/JoTT.03633.5421-33
- [40] Vane-Wright RI, Humphries CJ, Williams PH. What to protect?: Systematics and the agony of choice. *Biological Conservation*. 1991;**55**:235-254. DOI: 10.1016/0006-3207(91)90030-D
- [41] Villarreal-Quintanilla JA, Bartolomé-Hernández JA, Estrada-Castillón E, Ramírez-Rodríguez H, Martínez-Amador SJ. El elemento endémico de la flora vascular del Desierto Chihuahuense. *Acta Botanica Mexicana*. 2017;**118**:65-96. DOI: 10.21829/abm118.2017.1201
- [42] Donati D. *Corynopuntia halophila* (Cactaceae), a new species from Coahuila, Mexico. *Plant Biosystems*. 2018;**152**:386-397. DOI: 10.1080/11263504.2017.1297332
- [43] Turner BL. Taxonomic overview of the Mexican species of *Salvia* sect. *Flocculosae* (Lamiaceae). *Phyton*. 2013;**36**:1-11
- [44] JA V-Q, AE E-C. A new species of *Drymaria* (Caryophyllaceae) from northeastern Mexico. *Brittonia*. 2008;**60**:329-331. DOI: 10.1007/s12228-008-9028-x
- [45] Ruacho-González L, González-Elizondo MS, González-Elizondo M, López-González C. Diversidad florística en cimas de la Sierra Madre Occidental. *Botanical Science*. 2013;**91**:193-205
- [46] Rzedowski J. Catálogo preliminar de plantas vasculares de distribución restringida a la Sierra Madre oriental. In: *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo complementario XXXI*. México: Instituto de Ecología del Bajío; 2015. p. 36
- [47] Suárez-Mota E, Villaseñor JL, Ramírez-Aguirre MB. Sitios prioritarios para la conservación de la riqueza florística y el endemismo de la Sierra Norte de Oaxaca, México. *Acta Botanica Mexicana*. 2018;**124**:49-74. DOI: 10.21829/abm124.2018.1296
- [48] Hernández HM, Gómez-Hinostrosa C, Hoffmann G. Is geographical rarity frequent among the cacti of the Chihuahuan Desert? *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 2010;**81**:163-175

- [49] Wilson JS, Pitts JP. Illuminating the lack of consensus among descriptions of earth history data in the North American deserts: A resource for biologists. *Progress in Physical Geography*. 2010;**34**:419-441. DOI: 10.1177/0309133310363991
- [50] SEMARNAT. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 15 de diciembre de 2010. Available from: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010)
- [51] Dicht RF, Lüthy AD, Goettsch BK. *Coryphantha durangensis* (amended version of 2013 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species; 2017. e.T62361A121439780. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T62361A121439780
- [52] Fitz Maurice B, Sotomayor M, Fitz Maurice WA., Hernández HM, Smith M. *Echinocereus mapimiensis* (amended version of 2013 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species; 2017. e.T151774A121442820. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T151774A121442820.en
- [53] Fitz Maurice B, Gómez-Hinostrosa C, Fitz Maurice WA, Hernández HM. *Turbincarpus mandragora*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2013. e.T40982A2949250. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T40982A2949250
- [54] Fitz Maurice WA, Fitz Maurice B. *Mammillaria pennispinosa*. The IUCN Red List of Threatened Species; 2013. e.T40846A2936587. DOI: 10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T40846A2936587
- [55] Miranda R. Caracterización de la producción del cultivo de algodónero (*Gossypium hirsutum* L.) en la Comarca Lagunera. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 2008;**23**:696-705
- [56] Muro-Pérez G, Sánchez-Salas J, Alba-Ávila JA. Desarrollo agroindustrial: Reseña y perspectiva en la Comarca Lagunera, México. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 2012;**11**(1):1-7
- [57] Veiga AK, Cartolano EA Jr, Saraiva AM. Data quality control in biodiversity informatics: The case of species occurrence data. *IEEE Latin America Transactions*. 2014;**12**:683-693. DOI: 10.1109/TLA.2014.6868870





## 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

#### Keywords:

Nitrates  
Nitrite  
Methemoglobin  
Hypoxia  
Oxidative stress  
Liver injury

### ABSTRACT

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 (NO<sub>2</sub>) 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 (NaNO<sub>3</sub>) 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 NaNO<sub>3</sub>, respectively. Hematological, metabolic and histological biomarkers in the liver were analyzed. The results showed high percentages of methemoglobin, an increase in NO<sub>2</sub> 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 NaNO<sub>3</sub> in which high of S-nitrosylation were found. In conclusion, NaNO<sub>3</sub> was reduced to NO<sub>2</sub>, 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>) 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 peroxyxynitrite (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 (Kilfoy 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 <sup>3</sup> /μL)	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 <sup>6</sup> /μL)	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 <sup>3</sup> /μL)	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 (μg/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® 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 μm. 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× 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 Tuckey'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,c</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>b,c</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
<sup>e</sup> NO <sub>2</sub> in liver (µg/mL)	1.35 ± 0.19	1.58 ± 0.20 <sup>a,c</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

**Table 3**

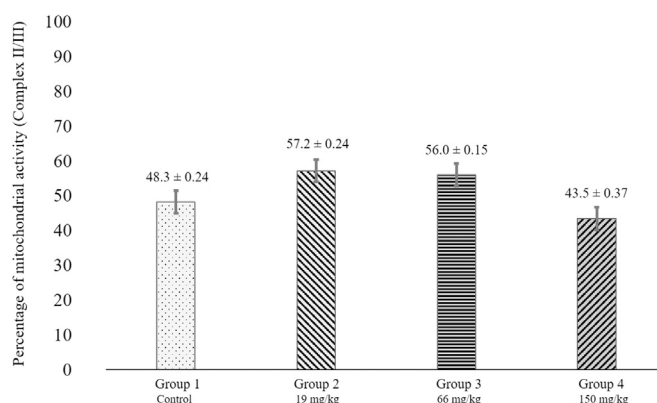
Response in oxidative stress biomarkers to subacute intoxication with NaNO<sub>3</sub> in male Wistar rats.

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>Cit</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>Cit</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. 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).

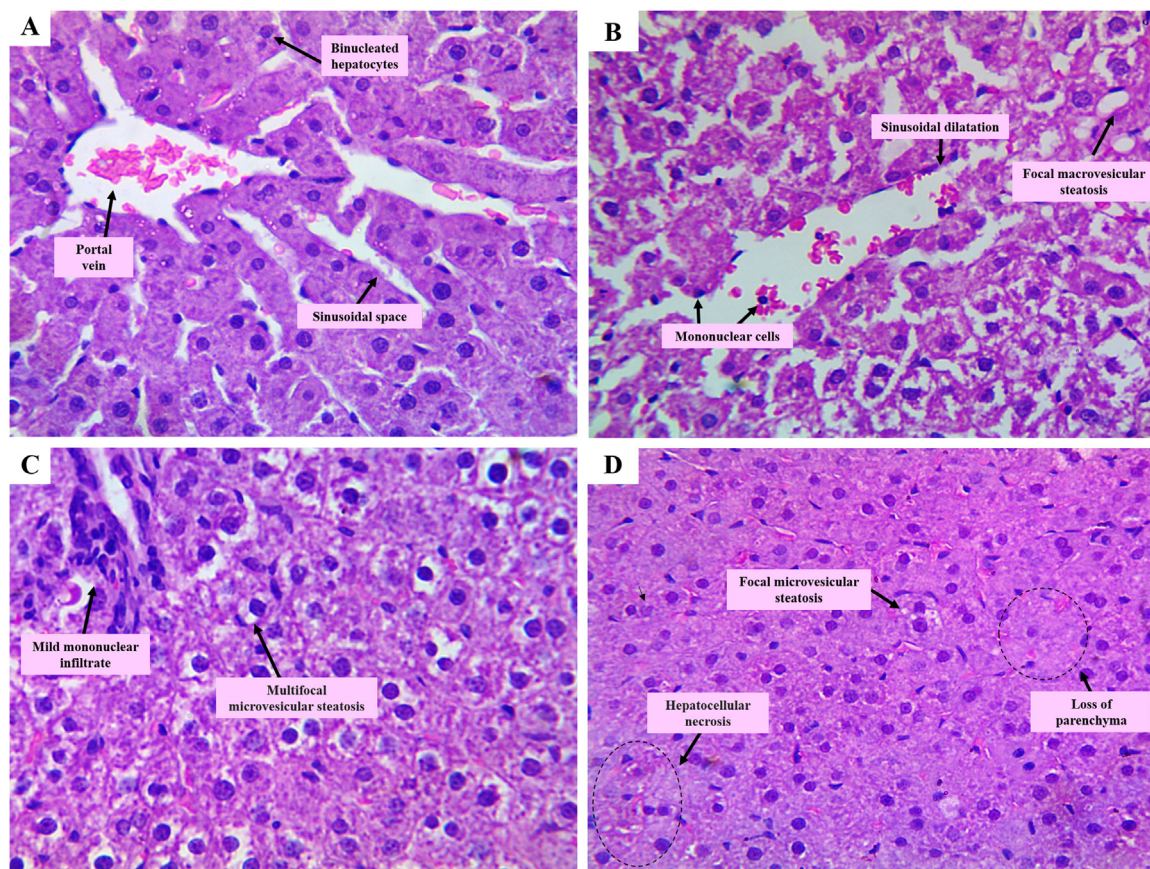
with the doses administered, the amount of NO<sub>2</sub> found in the plasma and liver tissue, the high levels of oxidative stress biomarkers and the histopathological injury observed in the liver.

## 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• and ONOO-, 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/>





**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, dilatation 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 (LD50 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 of 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  $\text{NaNO}_3$ .

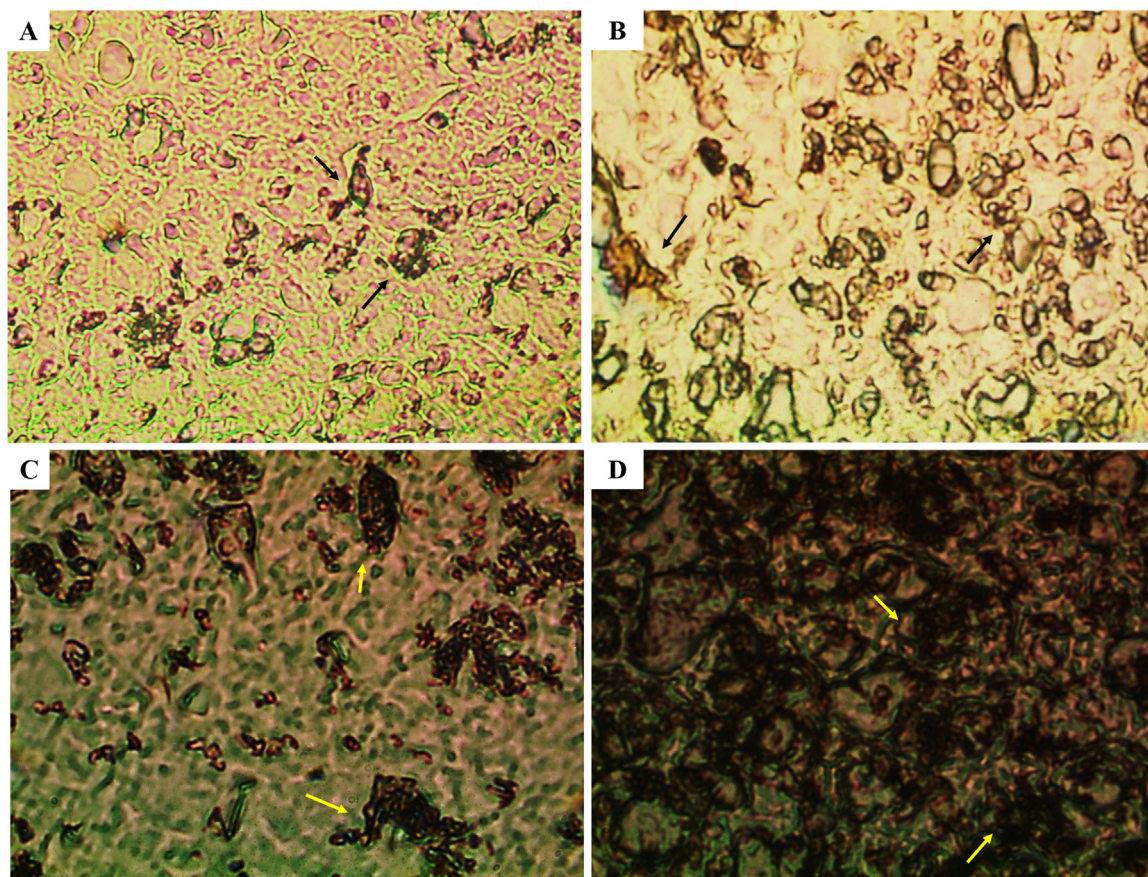
The formation of methemoglobin is the most common adverse effect of nitrate intoxication in animals and humans, and levels above of 50% can be lethal due to hypoxia. In this study, dose-related increases in  $\text{NO}_2$  in the plasma and a high percentage of methemoglobin higher than the reference 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-Wakf 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  $\text{NO}$  in vivo has been reported by Cosby et al. (2003), and  $\text{NO}$  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 NaNO<sub>3</sub>. Magnification 40×. Five representative samples from each group were prepared and analyzed for S-nitrosylation assay. A: Group 1 (control). B: Group 2 (19 mg/kg NaNO<sub>3</sub>). C: Group 3 (66 mg/kg NaNO<sub>3</sub>). D: (150 mg/kg NaNO<sub>3</sub>). An increase in the S-nitrosylation signal was observed as the concentration of NaNO<sub>3</sub> was augmented. The arrows indicate the aggregation of S-NO complexes.

pregnant cows chronically exposed to NO<sub>3</sub> in their diet. In our study, high levels of glucose, cholesterol, triglycerides, LDH, AST and ALT were found in the groups treated with NaNO<sub>3</sub>. 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 NaNO<sub>3</sub> 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 ONOO<sup>-</sup> produced by the interaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup> or O<sub>2</sub>.

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, Rodríguez-Estival et al. (2010) reported an increase in total GSH and SOD in the livers of birds treated with 500 mg/L NaNO<sub>3</sub> 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 NaNO<sub>3</sub> for 50 days. Moreover, Anwar and Mohamed (2015) reported that GSH decreased in female rats treated with 500 mg/L NaNO<sub>3</sub> 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 NaNO<sub>3</sub> 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 NaNO<sub>3</sub> 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 (Peleti 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 Verence 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

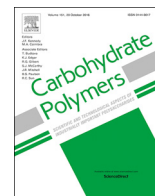
RPM and MFGD conceived of and designed the study and conducted the experimental assays. MEG participated in the establishment of the experimental model. AGZ participated in the analysis and discussion of the results and preparation of the draft manuscript. EMM performed and validated the histological 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/hsz-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., Fakhfekh, 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/10.3967/bes2014.105>.
- Bouaziz-Ketata, H., Salah, G.B., Mahjoubi, A., Aidi, Z., Kallel, C., Kammoun, H., Fakhfekh, F., Zeghal, N., 2015. *Hyparrhenia hirta*: a potential protective agent against hematotoxicity and genotoxicity of sodium nitrate in adult rats. *Environ. Toxicol.* 11, 1275–1284. <https://doi.org/10.1002/tox.21998>.
- Cosby, K., Partovi, K.S., Crawford, J.H., Patel, R.P., Reiter, C.D., Martyr, S., 2003. Nitrite



- reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat. Med.* 9 (12), 1498–1505. <https://doi.org/10.1038/nm954>.
- Davidson, J., Good, C., Welsh, C., Summerfelt, S., 2014. Comparing the effects of high vs. low nitrate on the health, performance, and welfare of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* within water recirculating aquaculture systems. *Aquac. Eng.* 59, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2014.01.003>.
- Eales, K.L., Hollinshead, K.E.R., Tennant, D.A., 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.50>.
- El-Wakf, A.M., Hassan, H.A., El-said, F.G., El-Said, A., 2009. The association between prolonged exposure to water nitrate pollution and increased blood methemoglobin level in both young and adult male rats. *J. Egypt Soc. Toxicol.* 49, 91–96.
- Erkekoglu, P., Baydar, T., 2010. Evaluation of the protective effect of ascorbic acid on nitrite- and nitrosamine-induced cytotoxicity and genotoxicity in human hepatoma line. *Toxicol. Mech. Methods* 20 (2), 45–52. <https://doi.org/10.3109/15376510903583711>.
- Espejo-Herrera, N., Cantor, K., Malats, N., Silverman, D., Tardon, A., García-Closas, 2015. Nitrate in drinking water and bladder cancer risk in Spain. *Environ. Res.* 137, 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.034>.
- Fouad, S.S., Mohi-Eldin, M., Haridy, M., Khalil, A., 2017. Ameliorative effects of ascorbic acid (Vit. C) against sodium nitrite toxicity in albino rats: hematological, biochemical and histopathological studies. *American-Eurasian. J. Toxicol. Sci.* 9 (1), 01–06. <https://doi.org/10.5829/idosi.aejts.2017.01.06>.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., Ma, X., 2017. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell. Physiol. Biochem.* 44, 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>.
- Hijmans, B.S., Grefhorst, A., Oosterveer, M.H., Groen, A.K., 2014. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences. *Biochimie* 96, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.06.007>.
- Kattaia, A., El-Baseta, S., Mohameda, E., Abdul-Maksoub, R., Elfakharany, Y., 2017. Molecular mechanisms underlying histological and biochemical changes induced by nitrate in rat liver and the efficacy of S-Allylcysteine. *Ultrastruct. Pathol.* 41 (1), 10–22. <https://doi.org/10.1080/01913123.2016.1252821>.
- Katri, J., Mills, E., Maskell, P., Odongere, C., Webb, A.J., 2017. It is rocket science – why dietary nitrate is hard to ‘beet’! Part I. Twist and turns in the realization of the nitrate – nitrite – NO pathway. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 83, 129–139. <https://doi.org/10.1111/bcp.12913>.
- Kilfoy, B.A., Zhang, Y., Park, Y., Holford, T.R., Schatzkin, A., Hollenbeck, A., Ward, M.H., 2011. Dietary nitrate and nitrite and the risk of thyroid cancer in the NIH-AARP diet and health study. *Int. J. Cancer* 129 (1), 160–172. <https://doi.org/10.1002/ijc.25650>.
- Kurutas, E.B., 2016. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr. J.* 15, 71. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5>.
- Messaadia, A., Saka, S., Krim, M., Maldi, I., Aouacheri, O., Djafer, R., 2013. Ginger-supplemented diet ameliorates ammonium nitrate-induced oxidative stress in rats. *Afr. J. Biotechnol.* 12 (49), 5909–5916. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13118>.
- Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J.R., Jansen, P.L., 1995. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin. Chem.* 41 (6), 892–896.
- Mukhopadhyay, S., Ghosh, D., Chatterjee, A., Sinha, S., Tripathy, S., Chandra, A.K., 2005. Evaluation of possible goitrogenic and anti-thyroidal effect of nitrate, a potential environmental pollutant. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 49 (3), 284–288.
- Muntané, J., De la Rosa, A., Marín, L., Padillo, F., 2013. Nitric oxide and cell death in liver cancer cells. *Mitochondrion* 13, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.09.004>.
- Peleti, M., Zollbrecht, C., Montenegro, M.F., Hezel, M., Zhong, J., Persson, E.G., Holmdahl, R., Weitzberg, E., Lundberg, J.O., Carlström, M., 2016. Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* 99, 472–484. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.004>.
- Pereira, C., Ferreira, N., Rocha, B., Barbosa, R., Laranjinha, J., 2013. The redox interplay between nitrite and nitric oxide: from the gut to the brain. *Redox Biol.* 1, 276–284. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.04.004>.
- Purnell, E.T., Singh, H., 2005. The hemotoxicity of para-substituted aniline analogs in dog and rat erythrocytes: a species comparison. *Ethn. Dis.* 15 (4 Suppl. 5) (S5–S1–7).
- Quist, A.J.L., Inoue-Choi, M., Weyer, P.J., Anderson, K.E., Cantor, K.P., Krasner, S., Freeman, L.E.B., Ward, M.H., Jones, R.R., 2018. Ingested nitrate and nitrite, disinfection by-products, and pancreatic cancer risk in postmenopausal women. *Int. J. Cancer* 142 (2), 251–261. <https://doi.org/10.1002/ijc.31055>.
- Ramakrishnan, S.K., Shah, Y.M., 2017. A central role for hypoxia-inducible factor (HIF)-2 $\alpha$  in hepatic glucose homeostasis. *Nutr. Healthy Aging* 4, 207–216. <https://doi.org/10.3233/NHA-170022>.
- Rebolledo, B., Gil, A., Flotats, X., Sánchez, J.A., 2016. Assessment of groundwater vulnerability to nitrates from agricultural sources using a GIS-compatible logic multi-criteria model. *J. Environ. Manag.* 171, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.01.04>.
- Rocha, B., Gago, B., Barbosa, R., Lundberg, J., Radi, R., Laranjinh, J., 2012. Intra-gastric nitration by dietary nitrite: implications for modulation of protein and lipid signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 693–698. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.011>.
- Rodríguez-Estival, J., Martínez Haro, M., Martín Hernando, Mateo, R., 2010. Sub-chronic effects of nitrate in drinking water on red-legged partridge (*Alectoris rufa*): oxidative stress and T-cell mediated immune function. *Environ. Res.* 110 (5), 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.03.008>.
- Rojas, A.Y., Pacheco, J., Esteller, M.V., Cabrera, S.A., Camargo-Valero, M., 2015. Spatial distribution of nitrate health risk associated with groundwater use as drinking water in Merida, Mexico. *Appl. Geography* 65, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2015.10.004>.
- Sadler, R., Maetam, B., Edokpolo, B., Connell, D., Yu, J., Stewart, D., 2016. Health risk assessment for exposure to nitrate in drinking water from village wells in Semarang, Indonesia. *Environ. Pollut.* 216, 738–745. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.06.041>.
- Sakata, M., Yoshida, A., Haga, M., 1982. Methemoglobin in blood as determined by double-wavelength spectrophotometry. *Clin. Chem.* 28 (3), 508–511.
- Sezer, K., Albay, M.K., Ozmen, O., Haligur, M., Sahinduran, S., Mor, F., Köker, A., 2011. Haematological, biochemical and thyroid gland investigations in pregnant cows and calves chronically intoxicated with nitrate. *Rev. Méd. Vét.* 162 (5), 223–228.
- Shukla, A., Saxena, A., 2018. In: Hussain, A.G.M. (Ed.), *Global Status of Nitrate Contamination in Groundwater: Its Occurrence, Health Impacts, and Mitigation Measures*. Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3\\_20-11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-58538-3_20-11).
- Till, H.P., Falke, H.E., Kuper, C.F., Willems, M.I., 1988. Evaluation of the oral toxicity of potassium nitrite in a 13-week drinking-water study in rats. *Food Chem. Toxicol.* 26 (10), 851–859.
- Voslářová, E., Pištěková, V., Svobodová, Z., Bedáňová, I., 2008. Nitrite toxicity to *Danio rerio*: effects of subchronic exposure on fish growth. *Acta Vet. Brno* 77, 455–460. <https://doi.org/10.2754/avb200877030455>.
- Zhai, Y., Zhao, X., Teng, Y., Li, X., Zhang, J., Wu, J., 2017. Groundwater nitrate pollution and human health risk assessment by using HHRA model in an agricultural area, NE China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 30–142. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.010>.



## Self-assembled high molecular weight inulin nanoparticles: Enzymatic synthesis, physicochemical and biological properties

Maira Jiménez-Sánchez<sup>a</sup>, Rebeca Pérez-Morales<sup>b</sup>, Francisco M. Goycoolea<sup>c</sup>, Monika Mueller<sup>d</sup>, Werner Praznik<sup>d</sup>, Renate Loepfert<sup>d</sup>, Víctor Bermúdez-Morales<sup>e</sup>, Guadalupe Zavala-Padilla<sup>f</sup>, Marcela Ayala<sup>a</sup>, Clarita Olvera<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 62250, Cuernavaca, Morelos, Mexico

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

<sup>c</sup> School of Food Science and Nutrition, University of Leeds, Woodlouse Ln, Leeds, LS2 9JT, United Kingdom

<sup>d</sup> Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmaceutics, Vienna University, Althanstrasse 14, A-1090, Wien, Austria

<sup>e</sup> Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Dirección de Infecciones Crónicas y Cáncer, Avenida Universidad No. 655, Cerrada los Pinos y Caminera, Colonia Santa María Ahuacatlán, Cuernavaca, 62100, Morelos, Mexico

<sup>f</sup> Unidad de Microscopía Electrónica, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, C. P. 62250, Cuernavaca, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Inulin  
Polysaccharide nanoparticles  
Enzymatic synthesis  
Fructan  
Inulosucrase

### ABSTRACT

Inulin has interesting physicochemical and functional properties, and therefore a wide range of applications in the food and medical industries. It has gained great traction due to its ability to form nanoparticles and its possible application as nanovehicle for drug delivery. In this work, we demonstrated that the enzymatically-synthesized high molecular weight (HMW) inulin forms stable spherical nanoparticles with an average diameter of  $112 \pm 5$  nm. The self-assemblage of HMW inulin nanoparticles is carried out during enzymatic synthesis of the polymer, and become detectable after a certain critical aggregation concentration (CAC) is reached. Both, the CAC and nanoparticle size are influenced by the reaction temperature. These nanoparticles are not toxic for peripheral blood mononuclear cells, at concentrations below 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; no significant prebiotic potential was detected in cultures of 13 probiotic strains. This work contributes to a better understanding of the formation of HMW inulin nanoparticles and their biological properties.

### 1. Introduction

Fructans are fructose polymers linked by glycosidic bonds which, depending on their origin, have different types of bonds between their monomers, percentage of branching and degree of polymerization (DP) (Madrigal & Sangronis, 2007). Depending on their linkage, fructans are classified as inulin or levan; inulin is a polymer consisting of fructose molecules linked by  $\beta$  (2  $\rightarrow$  1) bonds in the main chain and  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6) bonds within the branches; meanwhile, the levan polymer has  $\beta$  (2  $\rightarrow$  6) bonds in the main chain and  $\beta$  (2  $\rightarrow$  1) branching (Madrigal & Sangronis, 2007; Stephen et al., 2006). In general, fructans produced by plants have a low DP (between 2 and 60 fructose units), while bacterial fructans attain DP  $> 10^3$  fructose units (Ebisu, Kato, Kotani, & Misaki, 1975; Wada, Sugatani, Terada, Ohguchi, & Miwa, 2005).

Bacterial fructans are synthesized by enzymes known as

fructosyltransferases (FTFs). Depending on the polymer, they are classified into: levansucrase (EC 2.4.1.10), the enzyme producing levan, or inulosucrase (EC 2.4.1.9), the enzyme producing inulin (Chambert & Gonzy-Treboul, 1976). The enzymatic synthesis of high molecular weight (HMW) fructans is carried out through sequential transfers of fructosyl residues from sucrose to an acceptor molecule that can be sucrose itself, a growing polymer chain (transferase activity) or a molecule of water (hydrolytic activity) (Chambert & Gonzy-Treboul, 1976). In terms of the polymer molecular weight, reaction conditions are known to affect the size of the synthesized polymer by modulating the enzymatic mechanism (processive or non-processive) (Raga-Carbajal et al., 2016). The DP of these fructans defines its biological and physicochemical properties, which in turn allow a wide spectrum of biotechnological applications.

Fructans can be used for many applications in the food and

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [mairajs@ibt.unam.mx](mailto:mairajs@ibt.unam.mx) (M. Jiménez-Sánchez), [rebecapms@ujed.mx](mailto:rebecapms@ujed.mx) (R. Pérez-Morales), [F.M.Goycoolea@leeds.ac.uk](mailto:F.M.Goycoolea@leeds.ac.uk) (F.M. Goycoolea), [monika.mueller@univie.ac.at](mailto:monika.mueller@univie.ac.at) (M. Mueller), [werner.praznik@univie.ac.at](mailto:werner.praznik@univie.ac.at) (W. Praznik), [renate.loepfert@univie.ac.at](mailto:renate.loepfert@univie.ac.at) (R. Loepfert), [vbermudez@insp.mx](mailto:vbermudez@insp.mx) (V. Bermúdez-Morales), [gzavala@ibt.unam.mx](mailto:gzavala@ibt.unam.mx) (G. Zavala-Padilla), [maa@ibt.unam.mx](mailto:maa@ibt.unam.mx) (M. Ayala), [clarita@ibt.unam.mx](mailto:clarita@ibt.unam.mx) (C. Olvera).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.060>

Received 8 November 2018; Received in revised form 15 March 2019; Accepted 15 March 2019

Available online 18 March 2019

0144-8617/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

pharmaceutical industry. Within the food industry, they have been classified as functional ingredients and are generally recognized as safe (GRAS) by the FDA (Handa, Goomer, & Siddhu, 2012). Moreover, fructans are also classified as prebiotic agents, which are defined as non-digestible compounds that may be anaerobically fermented by the beneficial microbiota of the host; these fructans stimulate the bacterial growth that contribute to improve the hosts health (Roberfroid & Slavin, 2000). Furthermore, fructans have been shown to have an immunomodulatory effect on the intestine by increasing the levels of immunoglobulins, interleukins and interferons in peripheral blood mononuclear cells (Watzl, Girrbach, & Roller, 2005). Within the pharmaceutical industry, inulin has been used as tablet coating (Hinrichs, Prinsen, & Frijlink, 2001); it has also been used as vehicle for the administration of drugs through different routes such as oral, respiratory and parenteral routes: subcutaneously, intramuscularly and intravenously (Amorij et al., 2007).

Recently, research on the ability of fructans to form nanoparticles has fueled research on a new application for using them as nanometric drug carriers. Carboxymethylated low molecular weight inulin has been shown to form nanoparticles for encapsulation of small organic molecules, or as coating agent (Fares & Salem, 2015; Santiago-Rodríguez et al., 2013; Zhang et al., 2014). Moreover, phtalyl inulin nanoparticles have been reported with the capacity to stimulate the production of an antimicrobial peptide by *Pedococcus acidilactici* bacteria Kim et al. (2018). There are also recent reports regarding the use of HMW levan in the production of nanoparticles. Sezer, Kazak, Öner, and Akbuu, (2011) used this fructan (> 1000 kDa) for the nanoencapsulation of albumin as a model protein. The authors demonstrated that the agitation and protein concentration determined the particle size and encapsulation efficiency, obtaining particles within a size of 200–537 nm. Nakapong, Pichyangkura, Ito, Iizuka, and Pongsawasdi, (2013) reported the isolation of an enzyme from *Bacillus licheniformis* RN-01 able to catalyze the polymerization of fructose; the synthesized fructan was observed to self-assemble into nanoparticles of approximately 50 nm of diameter (Nakapong et al., 2013). Furthermore, Kim, Bae, and Chung, (2015) characterized self-assembled nanoparticles of a HMW levan (> 2000 kDa), with an average size of  $129.1 \pm 32.8$  nm; the nanoparticles could be used to encapsulate indocyanine green for breast cancer diagnosis. Finally, Tabernerero, González-Garcinuño, Sánchez-Álvarez, Galán, & Martín del Valle (2017), obtained nanoparticles of 300–500 nm, generated in water by a self-assembling process of a HMW levan produced by *A. nectaris* (Tabernerero et al., 2017). Despite above-mentioned studies demonstrating the fructan self-assembled nanostructure, no report exists regarding a deep analysis of the HMW fructan nanoparticles production during the enzymatic synthesis of the polymer. Besides, no studies about HMW inulin nanoparticles production and characterization have been reported.

In this work, we performed an analysis of the production of self-assembling inulin nanoparticles during the enzymatic synthesis of HMW polymer and the effect of reaction conditions over the synthesis and the size of fructan nanoparticles using the inulosucrase from *Leuconostoc citreum*. In addition, we analyzed the physicochemical and biological characteristics of these nanoparticles with the future objective of developing a nano-controlled release system for small molecules and biomolecules.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Isopropyl  $\beta$ -D-1-thyogalacto-pyranoside and kanamycin were purchased from Gold Biotechnology, Inc., St Louis, MO, USA. Complete EDTA-free was from Roche (Mannheim, Germany) and Bradford reagent was from Bio-Rad (Hercules, CA). Bovine serum albumin (BSA albumin fraction V) was provided by Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lymphoprep and RPMI medium were purchased from Invitrogen,

Thermo Scientific (Austin, TX, USA), while L-glutamine was from Gibco Thermo Scientific (Austin, TX, USA). All other agents used were of analytical grade.

### 2.2. Preparation of *Escherichia coli* cell extracts and purification of *IslA4*

*Escherichia coli* BL21 cells transformed with the pET28a-*IslA4* gene were grown in Luria Bertani broth containing  $50 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$  kanamycin at  $37^\circ\text{C}$  and 120 rpm. The culture was induced with 0.2 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thyogalacto-pyranoside. Once the cells reached an optical density of 0.6 ( $\text{OD}_{600}$ ,  $\lambda = 600$  nm) they were incubated at  $18^\circ\text{C}$  for 6 additional hours. The cells were then harvested by centrifugation ( $2500 \times g$  for 10 min) and the resulting pellet washed twice with a 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$  before being re-suspended in 5 mL of the same buffer containing Complete EDTA free (one tablet to 50 mL of cell extract), which were added as protease inhibitors, and sonicated. Cell debris was removed by centrifugation ( $21,130 \times g$  for 30 min) and the supernatant containing the enzyme was recovered for further processing. The protein concentration was determined according to the Bradford method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin (BSA) as standard. The enzyme was purified by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) on an ÄKTA prime (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) using a cation exchange CM-Sepharose column (GE Healthcare, Uppsala Sweden). The elution was performed with a phosphate buffer at pH 6.0 (gradient of 0.1–1.0 M). The eluted fractions were transferred to molecular filters to concentrate (Millipore molecular cut 10,000 Da) and centrifuged for 20 min at  $3700 \times g$  before addition of 100 mM acetate buffer pH 6 (supplemented with 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) to the molecular filters. The purity of *IslA4* was verified by SDS-PAGE.

### 2.3. Activity assay

Initial reaction rates were measured at  $30^\circ\text{C}$  in 100 mM phosphate buffer (pH 6.0) containing 1 mM  $\text{CaCl}_2$  in the presence of 292 mM sucrose. The global activity was expressed as the reducing sugars released from sucrose using the 3,5-dinitrosalicylic acid method (DNS) (Miller, 1959). One global activity unit (U) was defined as the amount of enzyme required to produce 1  $\mu\text{mol}$  of reducing sugars per minute. The specific hydrolysis and transferase activities were measured by HPLC based on the amounts of fructose and glucose. The HPLC method used in the current study is described below.

### 2.4. Carbohydrate analysis

Carbohydrates were quantified by high-pressure liquid chromatography (HPLC) using a Waters 600E system controller (Waters Corp. Milford, MA, USA) equipped with a refractive index detector (Waters 410) using a Prevail Carbohydrate ES column ( $250 \times 4.6$  mm) at  $30^\circ\text{C}$ . The HPLC system was run with a mobile phase consisting of a 75:25 (v/v) mixture of acetonitrile and water at a flow rate of  $1.0 \text{ mL}/\text{min}^{-1}$ . The molecular weight of inulin was determined by Size Exclusion Chromatography (SEC) using a serial set of Ultrahydrogel (UG 500 and linear) columns at  $30^\circ\text{C}$  with a refractive index detector (Waters 410). The columns were run with a mobile phase sodium nitrate 100 mM at a flow rate of  $0.8 \text{ mL}/\text{min}$ . Oligosaccharides were separated and analyzed by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD, Dionex), using a CarboPac PAD-200 column ( $250 \times 2$  mm, Dionex). The following gradient was used: eluent A at 100% (0 min), 99% (0.5 min), 80% (25 min), 20% (85 min) and 100% (95 min). Eluent A was 150 mM sodium hydroxide and eluent B was 150 mM sodium hydroxide in 500 mM sodium acetate.

### 2.5. Reductive methylation analysis (reductive cleavage method)

Methylation, reductive cleavage, and acetylation were performed

according to established procedures (Praznik, Löppert, & Helmut, 2007; Rolf & Gray, 1984). Well defined [(2-1)-linked  $\beta$ -D-Fruf] linkage-types of inulin from chicory (Orafti, Co; house prepared samples) and of house-prepared [(2-6)-linked  $\beta$ -D-Fruf] fructan from *Puccinellia peisonis* were applied as standards. Gas chromatography identification was performed on Shimadzu GC 2010 with a capillary column (DB 1701; 30 m, 0.25 mm i.d.: 0.25  $\mu$ m film thickness; Agilent, Co.), helium as carrier gas and FID (flame ionization detection) with the following temperature program: 80→135 °C at 10 °C/min, 135 → 155 °C at 2 °C/min, 155→200 °C at 3 °C/min, 200→260 °C at 5 °C/min. The injector and detector temperatures were 230 °C and 270 °C respectively. Measurements were performed with a split ratio of 1:5 in triplicate. The relative amount of each residue and the ratio of  $\beta$ -D-fructose- and  $\alpha$ -D-glucose-residues in the molecules were computed as the molar percentages from response-factor corrected GC/FID peak areas; the ratio of  $\beta$ -D-fructose and  $\alpha$ -D-glucose-residues assumes one  $\alpha$ -D-glucose residue for each molecule (Praznik et al., 2007).

## 2.6. Study of nanoparticles formation during enzymatic inulin production

A more stable, truncated version (IslA4) of the IslA enzyme produced by *L. citreum* CW28 was used as catalyst to study the formation of nanoparticles during the polymer synthesis. IslA4 lacks the N- and C-terminal regions, does not present auto-proteolysis and retain the ability to produce inulin of the same molecular weight as the wild-type enzyme (Del Moral, Olvera, Rodriguez, & Munguia, 2008). The enzymatic reactions were carried out using 0.5 U/mL of IslA4 enzyme and a sucrose concentration of 100 g/L in a 0.1 M sodium acetate buffer, pH 6.0 supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub> and a temperature of 30 °C under constant stirring. The reaction was stopped by boiling the samples for 5 min to inactivate the enzyme. All the reactions were allowed to proceed until they reached a sucrose conversion of approximately 90%. The reaction specificity (i.e., hydrolysis to transferase ratio) was determined by measuring the amounts of glucose and fructose released during the reaction. Free glucose (Gf) was derived from hydrolyzed sucrose as well as the sucrose was used as a fructose donor for the transferring reactions, whereas free fructose (Ff) was derived exclusively from the hydrolytic activity of the enzyme. The difference between the amounts of consumed and hydrolyzed sucrose could therefore be used to determine the amount of fructose used for transfructosylation (Ft) (i.e., transferase activity).

## 2.7. Test of the effect of the reaction conditions on the inulin nanoparticle size

For each reaction a sucrose concentration of 100 g/L and 0.5 U/ml of inulosucrase IslA4 was used in sodium acetate buffer (pH 6.0) supplemented with 1 mM CaCl<sub>2</sub> with varying the concentration of 50, 100 and 200 mM (ionic strength  $\mu$  of 0.005, 0.1 and 0.2 respectively) at a temperature of 30, 18 and 4 °C under constant stirring. The nanoparticle size was measured after 24 h of starting the enzymatic reaction.

## 2.8. Determination of the size distribution of nanoparticles

The intensity size (hydrodynamic diameter) distributions of the inulin nanoparticles were determined by dynamic light scattering (DLS) with non-invasive back scattering on a Zetasizer NanoZS instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern,UK) equipped with a 4 mW helium/neon red laser ( $\lambda$  = 633 nm) and the detection was at an angle of 173°. Measurements were performed at 30, 18 and 4 °C using 50  $\mu$ l from the enzymatic reaction. Analyses were performed in three different batches and the results were expressed as a mean of three measurements. The Zeta-potential was measured by phase analysis light scattering and mixed laser Doppler velocimetry (M3-PALS) in the same instrument. Measurements were performed at 30 °C by diluting an aliquot of 50  $\mu$ l from the enzymatic reaction in water.

## 2.9. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

NTA measurements were performed using a NanoSight LM10 instrument (NanoSight, Amesbury, UK), consisting of a conventional optical microscope, Marlin charged coupled device (CCD) camera, and a LM10 unit (sample unit) with a laser light source. LM10 is the first generation instrument from the NanoSight Company, which in the mean time has developed devices with additional features and upgraded software.

Following the manufacturer's instructions, we serially diluted all samples with sterile water or DPBS to reach a particle concentration suitable for the analysis with NTA ( $1.0 \times 10^8$  to  $2.5 \times 10^9$  particles/mL). We prepared at least two different sample dilutions for each sample and analyzed each one twice. The samples were injected into the LM unit (approximately 300  $\mu$ L) with a 1 mL sterile syringe. The capturing settings (shutter and gain) and analyzing settings were manually set according to the protocol suggested in the Technical note "How to make Concentration Measurements using NanoSight Equipment" (Technical Note, NanoSight, last updated 17/06/09) and then optimized for a specific virus or the latex particles. The NanoSight LM10 recorded 60-second sample videos that were then analyzed with the Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) 2.0 Analytical software release version build 0125.

## 2.10. Transmission electron microscopy (TEM) analysis inulin NPs

Five  $\mu$ L were taken from the enzymatic reaction and dropped onto a carbon-copper grid and air dried for 24 h. The excess sample was then removed with a filter paper and allowed to float on a drop (5  $\mu$ L) of 2% uranyl acetate for 1 min. The excess of uranyl is also removed with the aid of a filter paper. The grids with the samples tested by the negative staining method were observed in a transmission electron microscope brand ZEISS model Libra at an acceleration voltage 120 Kv with Gatan digital camera.

## 2.11. Cytotoxicity tests

The cytotoxicity assay was performed with neutral red assay based on an already published protocol (Repetto, del Peso, & Zurita, 2008). This method determines the accumulation of the neutral red dye in the lysosomes of viable cells. Three experiments were performed in triplicate. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC's) were obtained from a pool of 3 samples from clinically healthy women, ranging in age from 28 to 37 years. Cells were purified by density gradient with Lymphoprep. 50,000 cells were cultivated in RPMI medium supplemented with 5% of fetal bovine serum and 1% of L-glutamine. Exposure treatments with inulin polymer were at concentrations of 25, 50, 100, 150 and 200  $\mu$ g/mL by 24 h, followed by an incubation for 2 h with neutral red dye (4  $\mu$ g/mL) dissolved in serum free medium. Cells were washed with 1X phosphate buffer, 1 mL of elution solution (EtOH/AcCOOH, 50/1% v/v) was added, followed by gentle shaking. Aliquots of the resulting solutions were transferred to 96-well plates and absorbance at 540 nm was recorded using the microplate spectrophotometer system (Spectra max190-Molecular Devices).

The percentage of viability was obtained using the following formula:

$$\% \text{Viability} = \text{OD treated cells} \times 100 / \text{OD control cells}^*$$

A one-way ANOVA test was performed for multiple comparisons with Dunnet's ad hoc test comparing treatments against the untreated control group using GraphPad Prism 7.01 software. A 24-h treatment with ethanol was used as a positive cell death control\*.



## 2.12. Determination of the prebiotic potential

Growth curves of the probiotic strains in the presence of *Leuconostoc citreum* inulin were determined by turbidity measurement using Bioscreen C (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finland). With this method, the change of the OD<sub>600</sub> value was measured indicating bacterial growth. A fresh overnight culture was prepared. The cell amount required for a starting OD<sub>600</sub> of 0.1 was harvested, washed three times in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 0.5 g/L cysteine hydrochloride, and resuspended in MRS-medium without sugar. The negative control was incubated without sugar, whereas the samples were incubated in the presence of 1% sugars, in honeycomb plates at 37 °C for 48 h and the OD<sub>600</sub> was measured every hour after mixing for 15 s. The growth curves were determined 3 times and the results are shown as a mean.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Nanoparticles presence and physicochemical properties of HMW inulin from *Leuconostoc citreum*

Considering the self-assembly in water of HMW levan nanoparticles which is already reported (Kim et al., 2015; Nakapong et al., 2013; Taberero et al., 2017), we decided to assess nanoparticles presence in enzymatically-synthesized HMW inulin, using complete cells of *Leuconostoc citreum* as described by Ortiz-Soto, Olivares-Illana, and López-Munguía, (2004). The results obtained by dynamic light scattering (DLS) showed the presence of nanoparticles with a size distribution between 50 nm and 300 nm, a Z-average of the calculated diameter of  $112 \pm 5$  nm and a polydispersity index (PI) of  $0.069 \pm 0.01$  (Table 1). These results confirm the presence of HMW inulin nanoparticles with similar values to those reported for self-assembled HMW levan nanoparticles, where the Z-average was  $129 \pm 32$  nm (Nakapong et al., 2013); the molecular weight of the levan used in that study was > 2000 kDa, similar to the HMW inulin used in the present work (Table 1). Nakapong et al. (2013), reported self-assembled nanoparticles with 50 nm diameter, using a 612 kDa molecular weight levan. On the other hand, Taberero et al. (2017), obtained self-assembled nanoparticles from a HMW levan (6000 kDa) with a size ranging from ~300 to ~500 nm. It is possible that in the case of HMW fructans, a low molecular weight lead to smaller nanoparticles, compared to high molecular weight generating larger nanoparticles. This could be also a consequence of the branching and larger hydrodynamic diameter of HMW polymers (Wolff et al., 2000).

Table 1, summarizes the physicochemical properties of HMW inulin obtained using the inulosucrase from *L. citreum* CW28, as previously reported and as obtained in this work.

Polymer identification by NMR was previously reported by Olivares-Illana, Wachter-Rodarte, Le Borgne, & Lopez-Munguia (2002) and re-analyzed together with other properties in our workgroup (molecular weight, molecular weight average, and degree of polymerization) (Del Moral et al., 2008). In order to deepen the molecular characterization of this polymer, physicochemical properties were determined. For

instance, the branching percentage was determined by reductive methylation analysis and GC/FID identification. Considering a molecular weight of 3000 kDa, it was determined that the HMW inulin from *L. citreum* contains approximately ~18,519 fructose molecules, of which ~14,730 are linear fructose molecules, ~858 branched fructose, and ~1899 terminal fructose molecules. According to the relative amount of terminal fructosyl residues, the inulin of *Leuconostoc citreum* has a branching percentage of 10.03%, suggesting that there is a branch every 8 fructose units (Table 2). This branching percentage is greater than those reported for other HMW inulins; for example, 20,000 kDa inulin synthesized by a fructosyltransferase of *Streptococcus mutans* presents a branching percentage of 6.1%, whereas a mixture of low and high molecular weight inulin (14.9–5,000 kDa) produced by *Aspergillus sydowi* IAM 2544 has a branching percentage of 5.4% (Wolff et al., 2000). This higher branching percentage could influence the size and packing density of the nanoparticles, as Wolff et al. (2000) has been shown before for those inulin nanoparticles.

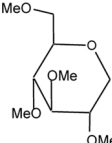
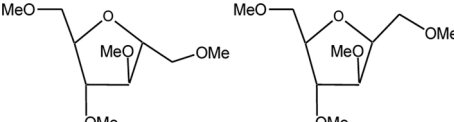
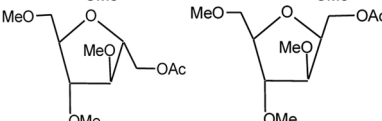
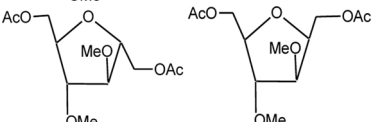
Besides branching, other physicochemical characteristic that could influence the glomerular structure of polymers is the Zeta-potential (Wolff et al., 2000). The Zeta-potential is a value that represents the electrostatic behavior of colloidal particles in the medium; it is related to the aggregation tendency of the particles in solution, so it is considered to reflect the stability of the colloidal system (Sundar, Kundu, & Kundu, 2010). The Zeta-potential value determination yielded a value of  $-10 \pm 1.8$  mV, indicating a slight negative charge. This value is similar to that for inulin nanoparticles that we have reported in a previous study (Sarkar et al., 2018) and is not far from that found by Carneiro-Da-Cunha, Cerqueira, Souza, Teixeira, and Vicente, (2011) for galactomannan polymer in solution. This last polymer is neutral like inulin, whose skeleton is formed by  $\beta$ -D-mannopyranose units linked by bonds (1→4), also containing  $\alpha$ -D-galactopyranose branches joined by bonds (1→6). The Zeta-potential values obtained for galactomannan nanoparticles, produced by *Caesalpinia pulcherrima* and *Gleditsia triacanthos*, were  $-5.7$  and  $-4.98$  mV respectively (Carneiro-Da-Cunha et al., 2011).

There are previous reports of formation of chemically modified low molecular weight inulin nanoparticles, such as inulin-carboxymethylated used to encapsulate magnetic nanoparticles (iron oxide) and phtalyl inulin nanoparticles (Kim et al., 2015, 2018). Also, it has been documented the production of nanoparticles modified with ibuprofen and the conjugated inulin with curcumin to form nanoparticles and thus achieve the solubility required for the release of this polyphenol (Fares & Salem, 2015; Santiago-Rodríguez et al., 2013; Zhang et al., 2014). However, in such studies, the Zeta-potential was not measured directly and was only deduced from electrophoretic mobility of charged particles under an applied electric field (Bhattacharjee, 2016). Accordingly, if the nanoparticle is chemically modified with another molecule, it will affect the final Zeta-potential value. Considering that inulin is a neutral polymer, it was not expected to obtain a Zeta-potential value that reveals the existence of some residual surface charge. Thus it was suggested that this value could be attributed to the presence of some negatively charged component attached to the surface of these nanoparticles. The amount of protein present in the sample was

**Table 1**  
Physicochemical characteristics of HMW inulin produced by *Leuconostoc citreum*.

Characteristic	Value	Source
Molecular weight	90 a 4400 kDa	Olivares-Illana et al. (2002), Del Moral et al. (2008)
Molecular weight average	3000 kDa	Del Moral et al. (2008)
Degree of polymerization	18, 500	Del Moral et al. (2008)
Hydrodynamic diameter	$112 \pm 5$ nm	Present work
Polydispersity index diameter	$0.069 \pm 0.01$	Present work
Branching percentage	$10.03 \pm 1$ %	Present work
Number of nanoparticles per ml	$2.83 \pm 0.2 \times 10^{12}$	Present work
Z Potential	$-10 \pm 1.8$ mV	Present work

**Table 2**  
Percentage (%) and number (n) per molecule of  $\beta$ -D-Fruf and  $\alpha$ -D-Glcp residues obtained by reductive methylation analysis, from HMW inulin produced by *Leuconostoc citreum*.

Fraction	%	Chemical structure
Terminal Glucose	0.17	
Terminal Fructose $\alpha$ and $\beta$	10.25	
Fru-lineal-2,1 $\alpha$ and $\beta$	79.54	
Branched-Fructose $\alpha$ and $\beta$	10.03	

$9.52 \times 10^{-3} \pm 0.28$  mg/ml, despite being a relatively low amount of protein, it could be responsible for the slight negative charge yielded. In general, particles whose Zeta-potential is within the range of +30 mV and -30 mV are considered to have a tendency to aggregate (Wongsagonsup, Shobsngob, Oonkhanond, & Varavinit, 2005). Given that, the Zeta-potential of inulin nanoparticles is within this range, the particles may be unstable. In order to confirm this, changes in size were monitored for 15 days by DLS. The hydrodynamic diameter was constant, suggesting that despite the low Zeta-potential value, the nanoparticles are stable and do not tend to aggregate.

The quantification of the number of nanoparticles in solution was  $2.83 \times 10^{12}$  nanoparticles/mL (Table 1), these particles were individually visualized and a size distribution of ~32 to ~232 nm was observed upon analysis of a sample containing 5 g/L of HMW inulin. Within this distribution, the particle size mode was  $84.4 \pm 24.5$  nm, with a concentration of  $42.61 \times 10^{10}$  nanoparticles/mL.

### 3.2. Study of inulin nanoparticles formation during enzymatic synthesis

In order to elucidate whether the inulin nanoparticles are formed during the enzymatic synthesis, a truncated version of the IsIA enzyme produced by *L. citreum* CW28, IsIA4, was used. IsIA4 lacks the N- and C-terminal regions does not present auto-proteolysis, and retains the ability to produce inulin of the same molecular weight as the wild-type enzyme (Del Moral et al., 2008). Both, polymer production and particle size were monitored during the enzymatic reaction by DLS analyses. The reaction was followed for 36 h, reaching a final nanoparticle size of 97 nm and a final inulin concentration of 22.91 g/L, as shown in Fig. 1A. The appearance of nanoparticles was detected after 30 min of reaction when produced inulin was 15.17 g/L. The average hydrodynamic diameter of these nanoparticles was 67.33 nm (Fig. 1B). The sudden appearance of inulin nanoparticles during the polymer synthesis suggests that there might be an inulin critical aggregation concentration (CAC). It is proposed that the CAC is the amount of polymer required for the assembly of nanoparticles (Dan, Ghosh, & Moulik, 2009). In the case of HMW inulin we determined a CAC of 15.17 g/L for the assembly of the nanoparticles under the studied conditions (Fig. 1A). The identification of CAC has already been reported for the self-assembly of low molecular weight inulin nanoparticles where, the aggregation concentration was 0.072 g/L, generating nanoparticles of

180 nm (Dan et al., 2009). This concentration is two orders of magnitude lower than the observed in the present work; this discrepancy is probably due to the difference in size and branching between the polymers.

In order to determine the morphology of the observed nanoparticles, transmission electron microscopy (TEM) was performed. Fig. 2, shows micrographs of the reaction mixture after 36 h, corresponding to 95% sucrose conversion and 22.9 g/L inulin. In these micrographs, spherical particles of various sizes can be observed which are within the size distribution determined by DLS (Fig. 2A and B). Fig. 2C shows two isolated nanoparticles of ~260 and ~280 nm approximately where, in addition to the circular morphology, a concave structure is observed, thus suggesting that these nanoparticles could be hollow. However, further analysis by scanning electron microscopy (SEM) imaging and spectroscopic ellipsometry could corroborate the validity of this hypothesis. Based on these results, we can conclude that HMW inulin arranges into self-assembled nanoparticles during the enzymatic synthesis of the polymer, catalyzed by IsIA4.

### 3.3. Effect of reaction conditions on the inulin nanoparticles formation

The influence of physicochemical factors such as temperature and ionic strength on the formation of polysaccharide nanoparticles has already been reported (Carneiro-Da-Cunha et al., 2011; Kumar et al., 2015; Li, Jiang, Chen, Yang, & Guan, 2004; Nakapong et al., 2013; Sharma, Madan, & Lin, 2016). Cations can affect the conformational properties of the nanoparticles since they might interfere with the hydrogen bonds within the structure (Li et al., 2004). On the other hand, the temperature can affect not only the rheological behavior of inulin, but also the enzymatic reaction rate that in turn could influence the nanoparticle formation (Kumar et al., 2015). In order to analyze the effect of the ionic strength and temperature on the hydrodynamic diameter of the enzymatically synthesized inulin nanoparticles, we performed the enzymatic reaction using different buffer solution concentrations and three temperatures 4, 18 and 30 °C. The hydrodynamic diameter average of the inulin nanoparticles was determined by DLS at 90% sucrose conversion. As depicted in Fig. 3, minimal variation of the particle size was observed when the ionic strength was modified. This was confirmed when a correlation study between these variables was performed using the R Studio program. The value obtained for the

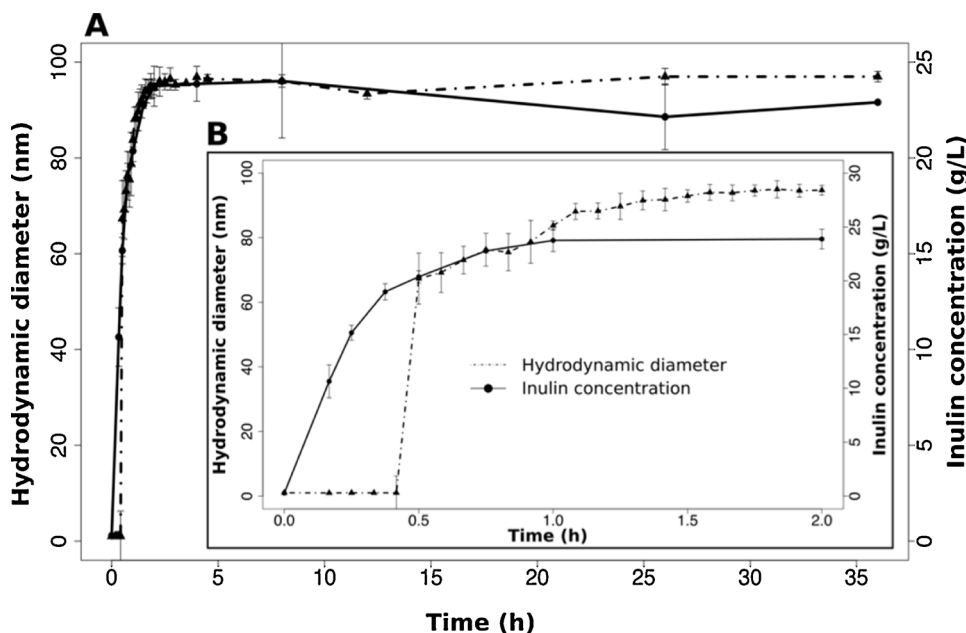


Fig. 1. Kinetics of inulin production (solid line) and evolution of the hydrodynamic diameter average of inulin nanoparticles (dot-dashed line). Reaction conditions 0.5 U/ml of IsIA4, 100 g/L sucrose at 30 °C in 100 mM buffer pH 6. Insert: first 2 h of the reaction.

correlation between the ionic strength and the particle size was 0.17, demonstrating that there is no significant correlation for this range of salt concentration.

On the other hand, it was observed that decreasing the temperature resulted in a nanoparticle size increase. The highest effect was observed between a 30 and 4 °C reaction in a 0.2 M buffer, obtaining a 32% increase in nanoparticle size. Regarding the correlation between temperature and particle size, a high negative correlation was observed (-0.88), which shows that the temperature is a factor with a strong influence on the formation of the nanoparticles. Considering these results, our focus was only on the temperature effect on the nanoparticle size. It has been suggested that temperature can affect nucleation and particle growth (Thanh, Maclean, & Mahiddine, 2014). This growth is usually slower at a lower temperature, favoring the kinetic stabilization process of the nanoparticles, which will promote larger and more stable particles. Also, by reducing the temperature the reaction rate for the enzyme IsIA4 decreases and so does the production rate of the polymer (Del Moral et al., 2008).

To examine the effect of the temperature at 4 °C on the evolution of the nanoparticles hydrodynamic diameter, we monitored an enzymatic reaction for 36 h under the same conditions described above but at greater temperature. As seen in Fig. 4A, the sudden appearance of the nanoparticles also occurs under these conditions; however, the time of

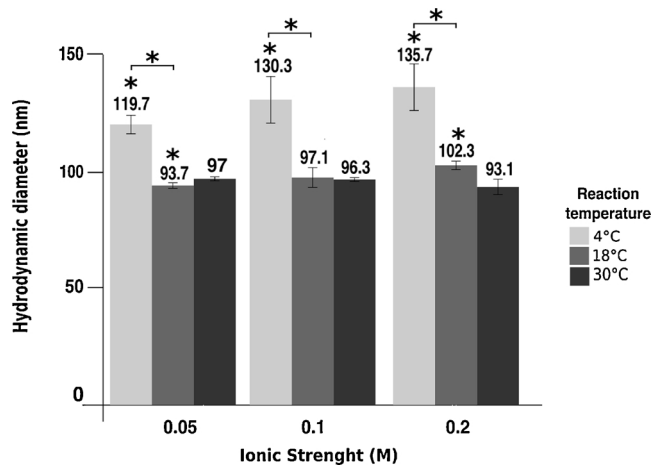


Fig. 3. Average hydrodynamic diameter in function of ionic strength and temperature. Measurements were performed by DLS using 50 µl of reactions Reaction conditions: 0.5 U/ml of IsIA4, 100 g/L sucrose, buffer pH 6 at 24 h after starting the enzymatic reaction.

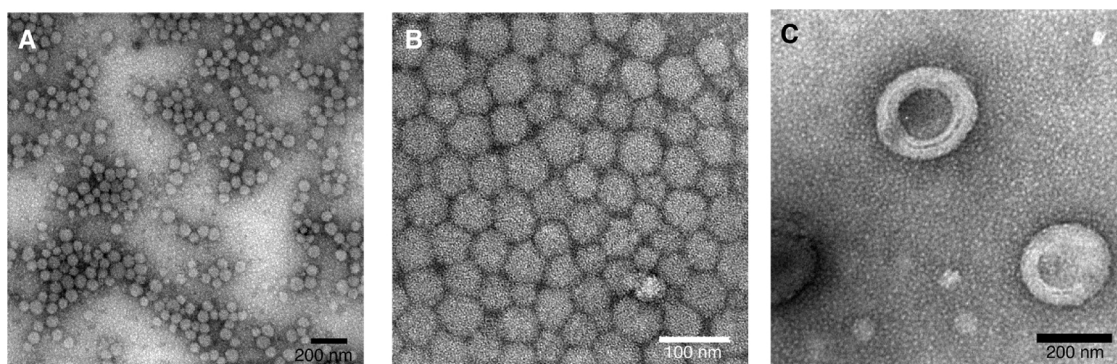


Fig. 2. TEM micrographs of inulin nanoparticles produced during an enzymatic reaction using IsIA 4 (0.5 U/ml, 100 g/L sucrose) after a 36 h-reaction. A) 10k B) 20k C) 40k.



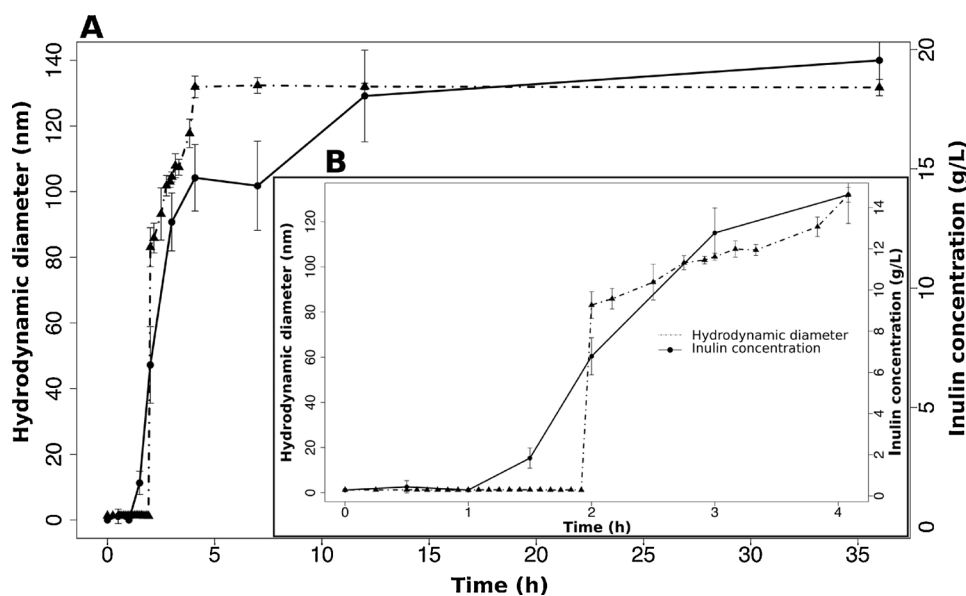


Fig. 4. Kinetics of inulin production (solid line) and evolution of the hydrodynamic diameter average of inulin particles (dot-dashed line). Reaction conditions: 0.5 U/ml of IsIA4, 100 g/L sucrose at 4 °C in 100 mM buffer pH 6. Insert: first 4 h of the reaction.

appearance and inulin concentration were different from those at 30 °C. The nanoparticles appear at an inulin concentration of 6.78 g/L, 1.5 h after the reaction started and at substrate conversion of 32% (Fig. 4B). The critical aggregation concentration was 44% lower than that recorded at 30 °C, and consequently, also a lower substrate conversion (32 vs 58%) was required to observe the nanoparticles. This is the first study where the nanoparticle size and formations are monitored during an enzymatic reaction.

Regarding the effect of temperature on the onset of nanoparticle formation, a lower temperature could favor the nucleation rate thus requiring a lower inulin concentration to observe the particles. Other factors that could influence the process, such as the molecular weight of the fructans, are not a determinant in this case. For instance, an increase in the molecular weight of the levan synthesized by the *B. subtilis* levansucrase (SacB) has been reported as the reaction temperature decreased to 4 °C (Porras-Domínguez, Ávila-Fernández, Miranda-Molina, Rodríguez-Alegría, & Munguía, 2015). However, for IsIA4 the molecular weight of the polymer remains the same whether the reaction takes place at 30 or 4 °C (data not shown).

The morphology of inulin nanoparticles enzymatically synthesized at 4 °C was analyzed by TEM. In Fig. 5, spherical nanoparticles of

80–130 nm are observed (Fig. 5A) which are consistent with data recorded by DLS (Fig. 4) and morphologically similar to those observed in reactions at 30 °C (Fig. 2). However, large amorphous aggregates can also be observed as well as fibers with a thickness of about 20 nm (Fig. 5B). These results are similar to those already reported in 2015, where they observed nanoparticles and fibers of chicory inulin by TEM (Cooper et al., 2015).

The presence of these amorphous aggregates together with the increase in the average of the hydrodynamic diameter of the inulin nanoparticles enzymatically synthesized at 4 °C, reinforces the notion that the reaction conditions mainly affect the structuring of the nanoparticles. The temperature could be directly affecting the molecules of inulin by reducing their movement, allowing these molecules to arrange in such way that they form fibers, possibly as intermediates, favoring the existence of larger and stable spherulite-type particles. This type of morphology consists of several lamellae branching from a central nucleus, and it could be possible that lamellae are structured by the observed fibers (Cruz Herrera, 2012).

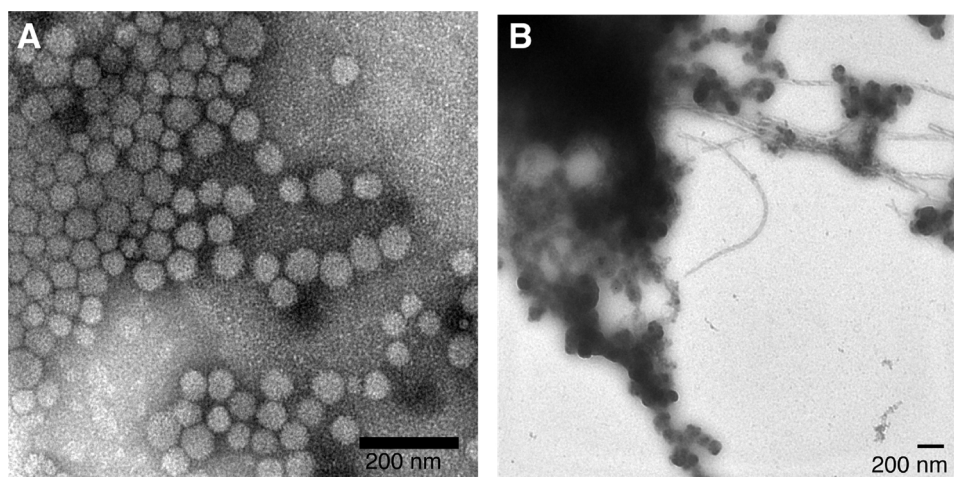


Fig. 5. TEM micrographs of inulin nanoparticles, enzymatically synthesized, at 4 °C and after 73% substrate conversion. A) 20 K, B) 6.3 K.

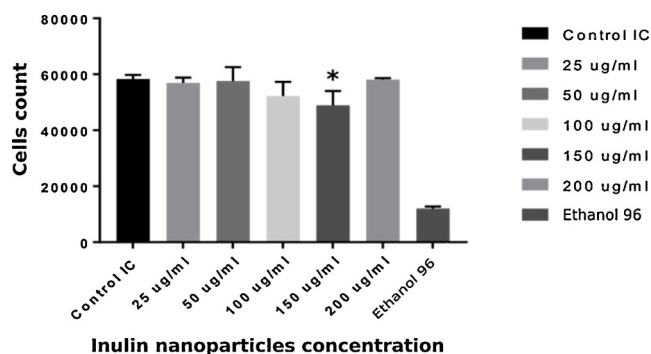


Fig. 6. The concentration range was 50–200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Viability was decreased in the concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p = 0.04$ ) and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p = 0.02$ ) these differences were significant with respect to the control. Although these data are significant, cell viability remains above 85%. One-way ANOVA test followed by Dunnet's multiple comparison test was applied to compare treatment with controls. Three independent experiments in triplicate were performed and results are expressed as means  $\pm$  SDs. \* P values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

### 3.4. Nanoparticles biological properties

#### 3.4.1. Cytotoxicity

Natural polysaccharides are effective nanocarriers for delivery of active ingredients or drugs. In this study, no cytotoxicity was observed at concentrations of 50–200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concerning to negative control (without inulin nanoparticles) and cell viability remained above 85% in all treatments, while the positive control significantly decreased the viability percentage as shown in Fig. 6. The concentrations analyzed did not generate cytotoxicity, in addition, polysaccharides such as inulin can stimulate the immune response through the activation of interleukins and interferon (Vogt et al., 2014). In another study, it was observed that fructan polymers could protect intestinal epithelial cells against harmful agents, so their properties like probiotic are preserved (Vogt et al., 2013). Ahmed, Zahran, and Emam (2016) analyzed different formulations of nanoparticles based on polysaccharides and no cytotoxicity was observed. Thus, it is suggested that they are safe in their administration as a vehicle, due to their versatility and low toxicity have been used as a vehicle for the release of chemotherapeutic agents (Ahmed et al., 2016).

#### 3.4.2. Probiotic potential

Considering the null toxicity of inulin and their ability to reach the intestine virtually intact, due to their resistance to direct degradation by the host, these HMW inulin nanoparticles could be ideal as colon site-directed drug carriers, where they could be degraded by the microbiota. However, there are no reports on the prebiotic potential of a HMW inulin. For this reason, it was decided to test the growth of 13 different probiotic strains using this type of inulin nanoparticles as the only source of carbon. Fructose and FOS Orafiti (inulin type fructooligosaccharides) were used as a positive control whereas cultures without carbon source were used as negative control.

Fig. 7, shows the maximum optical density ( $\text{MOD}_{600\text{nm}}$ ) reached after 48 h of culture. For fructose, similar growth was observed for all strains with  $\text{MOD}_{600\text{nm}}$  between 1.53 and 1.68. Regarding FOS Orafiti, values of  $\text{MOD}_{600\text{nm}}$  between 1.43 and 1.63 were registered. In contrast, no growth was observed when using HMW inulin as the only carbon source, suggesting that this polymer has no prebiotic potential. The prebiotic character of low molecular weight inulin ( $\text{DP} = 36$ ) has been reported before (Baston, Neagu Bonciu, & Bahrim, 2012; Makras, Van Acker, & De Vuyust, 2005). However, the high molecular weight of the inulin used in the present work ( $\text{DP} = 18,500$ ), could be the limiting factor for the growth of probiotic strains.

The results presented in this section demonstrate that the

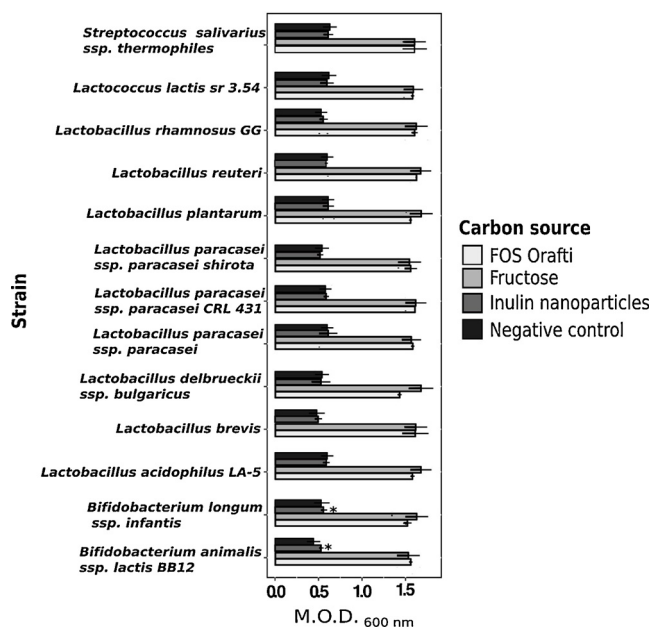


Fig. 7. Maximum optical density (M.O.D. 600 nm) of probiotic strains using fructose, Orafiti FOS, and HMW inulin, as the only carbon source. The M.O.D.600 nm was measured after 48 h of incubation.

*Leuconostoc citreum* inulin nanoparticles synthesized by the enzyme Isla do not show a prebiotic potential by the strains studied, although a different outcome could be obtained in vivo as, the metabolism of fructans in the intestinal tract is a cooperative process between different species (syntrophism) (Rossi et al., 2005).

## 4. Conclusion

In the present study, a deep characterization of the physicochemical properties of HMW inulin was performed; this particular fructan has a branching percentage of  $10.03 \pm 1\%$ , higher than other reported for HMW inulins. HMW inulin is nanostructured in spherical particles with a Z-average of the calculated diameter of  $112 \pm 5$  nm and a polydispersity index of  $0.069 \pm 0.01$ . The Zeta-potential of this nanoparticles was  $-10 \pm 1.8$  mV, our studies demonstrate that this slightly negative value is due to the presence of protein in the nanoparticles. Although Zeta-potential value corresponds to particles with a tendency to aggregate, stability assays demonstrated that inulin nanoparticles are stable at least for 15 days.

We also demonstrated that self-assembly of HMW inulin nanoparticles is carried out during enzymatic synthesis of the polymer, observing the existence of a critical aggregation concentration, which is influenced by the reaction temperature. The lower temperature of the enzymatic reaction resulted in an increase of the nanoparticle size, reaching an average hydrodynamic diameter of 131 nm. Under these conditions, other arrangements (fibers) could be detected. Finally, we demonstrated that these nanoparticles are not toxic for peripheral blood mononuclear cells, under concentrations as high as 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; besides, no prebiotic potential was detected in vitro assays using individual probiotic strains.

In general, these results will allow us a better comprehension of the fructan nanoparticles synthesis and factors that affect its synthesis, in order to manipulate the nanoparticle production for example to regulate its size. The results of the biochemical and physicochemical characterization suggest the HMW inulin nanoparticles could be used as a novel drugs delivery system or other molecules of interest. Further work is in progress regarding the encapsulation of biomolecules by these nanoparticles as well as its uptake by eukaryotic cells; also immunomodulatory effect analysis of these HMW inulin nanoparticles are

still in progress.

## Author contributions

CO and MJS conceived the study and designed the experiments. MJS performed the enzymatic experiments. MJS, WP, RL and FMG carried out analysis to the physicochemical characterization of HMW inulin. MJS and GZP obtained the TEM nanoparticles micrographies. RPM performed cytotoxicity test. MJS and MM carried out the prebiotic potential analysis. CO, MJS, MA, MM, RPM, FMG and VBM analyzed data and wrote the manuscript. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

## Acknowledgments

MJS acknowledges the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for providing the MsD grant No. 663659. The authors thank Fernando Gonzalez, Rosa Roman, Oscar Quiñonez & Ricardo Castro for their technical assistance. This work was supported by Universidad Nacional Autónoma de México (grant UNAM-PAPIIT IN213616) and the CONACyT (grant CONACyT-BMBF-2015-267620).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.060>.

## References

- Ahmed, H. B., Zahran, M. K., & Emam, H. E. (2016). Heatless synthesis of well dispersible Au nanoparticles using pectin biopolymer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.060>.
- Amorij, J.-P., Meulenaar, J., Hinrichs, W. L. J., Stegmann, T., Huckriede, A., Coenen, F., ... Frijlink, H. W. (2007). Rational design of an influenza subunit vaccine powder with sugar glass technology: Preventing conformational changes of haemagglutinin during freezing and freeze-drying. *Vaccine*, 25(35), 6447–6457. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.06.054>.
- Baston, O., Neagu Bonciu, C., & Bahrim, G. (2012). Preliminary study of lactic acid production from inulin hydrolysates using *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, XVI, 79–85. Retrieved from <http://www.biotechnologyjournal.usamv.ro/pdf/vol16/art14.pdf>.
- Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Carneiro-Da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85(3), 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.03.001>.
- Chambert, R., & Gonzy-Treboul, G. (1976). Levansucrase of *Bacillus subtilis*: Kinetic and thermodynamic aspects of transfructosylation processes. *European Journal of Biochemistry*, 62(1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10097.x>.
- Cooper, P. D., Rajapaksha, K. H., Barclay, T. G., Ginic-Markovic, M., Gerson, A. R., & Petrovsky, N. (2015). Inulin crystal initiation via a glucose-fructose cross-link of adjacent polymer chains: Atomic force microscopy and static molecular modelling. *Carbohydrate Polymers*, 117(2), 964–972. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.022>.
- Cruz Herrera, L. (2012). *Caracterización de nanocompuestos de polietileno-co-octadeceno con tio2, preparados mediante polimerización in-situ*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.
- Dan, A., Ghosh, S., & Moulik, S. P. (2009). Physicochemical studies on the biopolymer inulin: A critical evaluation of its self-aggregation, aggregate-morphology, interaction with water, and thermal stability. *Biopolymers*, 91(9), 687–699. <https://doi.org/10.1002/bip.21199>.
- Del Moral, S., Olvera, C., Rodriguez, M. E., & Munguia, A. L. (2008). Functional role of the additional domains in inulosucrase (IsIA) from *Leuconostoc citreum* CW28. *BMC Biochemistry*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-9-6>.
- Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., & Misaki, A. (1975). Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Strep. salivarius*. *Journal of Biochemistry*, 78(5), 879–887. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1213996](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1213996).
- Fares, M. M., & Salem, M. S. (2015). Dissolution enhancement of curcumin via curcumin-prebiotic inulin nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 30(January (00)), 1–8. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1004184>.
- Handa, C., Goomer, S., & Siddhu, A. (2012). Physicochemical properties and sensory evaluation of fructooligosaccharide enriched cookies. *Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 192–199. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0277-4>.
- Hinrichs, W. L. J., Prinsen, M. G., & Frijlink, H. W. (2001). Inulin glasses for the stabilization of therapeutic proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 215(1–2), 163–174. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00677-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00677-3).
- Kim, S. J., Bae, P. K., & Chung, B. H. (2015). Self-assembled levan nanoparticles for targeted breast cancer imaging. *Chemical Communications*, 51(1), 107–110. <https://doi.org/10.1039/c4cc07679f>.
- Kim, W. S., Lee, J. Y., Singh, B., Maharjan, S., Hong, L., Lee, S. M., ... Cho, C. S. (2018). A new way of producing pediocin in *Pediococcus acidilactici* through intracellular stimulation by internalized inulin nanoparticles. *Scientific Reports*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24227-z>.
- Kumar, R., Manjunatha, S., Kathiravan, T., Vijayalakshmi, S., Nadanabapathi, S., & Raju, P. S. (2015). Rheological characteristics of inulin solution at low concentrations: Effect of temperature and solid content. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5611–5620. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1671-5>.
- Li, R., Jiang, Z., Chen, F., Yang, H., & Guan, Y. (2004). Hydrogen bonded structure of water and aqueous solutions of sodium halides: A Raman spectroscopic study. *Journal of Molecular Structure*, 707(1–3), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.07.016>.
- Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(4), 387–396. Retrieved from [http://sportnutrition.sport.gov.mo/images/pt/img\\_osteo\\_g1.jpg](http://sportnutrition.sport.gov.mo/images/pt/img_osteo_g1.jpg).
- Makras, L., Van Acker, G., & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6531–6537. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6531-6537.2005>.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.
- Nakapong, S., Pichyangkura, R., Ito, K., Iizuka, M., & Pongsawadsi, P. (2013). High expression level of levansucrase from *Bacillus licheniformis* RN-01 and synthesis of levan nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54(1), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.017>.
- Olivares-Illana, V., Wachter-Rodarte, C., Le Borgne, S., & Lopez-Munguia, A. (2002). Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28, 112–117. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/700022>.
- Ortiz-Soto, M. E., Olivares-Illana, V., & López-Munguía, A. (2004). Biochemical properties of inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 used for inulin synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 22(4), 275–281. <https://doi.org/10.1080/10242420400014251>.
- Porrás-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Miranda-Molina, A., Rodríguez-Alegría, M. E., & Munguía, A. L. (2015). *Bacillus subtilis* 168 levansucrase (SacB) activity affects average levan molecular weight. *Carbohydrate Polymers*, 132, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.056>.
- Praznik, W., Löppert, R., & Helmut, A. (2007). *Analysis and molecular composition of fructans from different plant sources. Recent advances in Fructooligosaccharides 93–117*.
- Raga-Carbajal, E., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Porrás-Domínguez, J., López-Munguía, A., & Olvera, C. (2016). Size product modulation by enzyme concentration reveals two distinct levan elongation mechanisms in *Bacillus subtilis* levansucrase. *Glycobiology*, 26(4), 377–385. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwv112>.
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.
- Roberfroid, M., & Slavin, J. (2000). Nondigestible Oligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(6), 461–480. <https://doi.org/10.1080/10408690091189239>.
- Rolf, D., & Gray, G. R. (1984). Analysis of the linkage positions in d-fructofuranosyl residues by the reductive-cleavage method. *Carbohydrate Research*, 131(1), 17–28. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(84\)85399-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(84)85399-9).
- Rossi, M., Corradini, C., Amaretti, A., Nicolini, M., Pompei, A., Zanoni, S., ... Matteuzzi, D. (2005). Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: A comparative study of pure and fecal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6150–6158. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6150>.
- Santiago-Rodríguez, L., Lafontaine, M. M., Castro, C., Méndez-Vega, J., Latorre-Esteves, M., Juan, E. J., ... Rinaldi, C. (2013). Synthesis, stability, cellular uptake, and blood circulation time of carboxymethyl-inulin coated magnetic nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B, Materials for Biology and Medicine*, 1(22), 2807–2817. <https://doi.org/10.1039/C3TB20256A>.
- Sarkar, A., Ademuyiwa, V., Stubble, S., Esa, N. H., Goycoolea, F. M., Qin, X., ... Olvera, C. (2018). Pickering emulsions co-stabilized by composite protein/ polysaccharide particle-particle interfaces: Impact on in vitro gastric stability. *Food Hydrocolloids*, 84, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.019>.
- Sezer, A. D., Kazak, H., Öner, E. T., & Akbu, J. (2011). Levan-based nanocarrier system for peptide and protein drug delivery: Optimization and influence of experimental parameters on the nanoparticle characteristics. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 358–363. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.046>.
- Sharma, N., Madan, P., & Lin, S. (2016). Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(3), 404–416. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.09.004>.
- Stephen, A., Phillips, G., & Williams, P. (Eds.). (2006). *Food polysaccharides and their applications* CRC Press <https://doi.org/10.1201/9781420015164>.
- Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and*

- Technology of Advanced Materials*, 11(1), 014104. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>.
- Taberero, A., González-Garcinuño, Á., Sánchez-Álvarez, J. M., Galán, M. A., & Martín del Valle, E. M. (2017). Development of a nanoparticle system based on a fructose polymer: Stability and drug release studies. *Carbohydrate Polymers*, 160, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.025>.
- Thanh, N. T. K., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, 114(15), 7610–7630. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>.
- Vogt, L. M., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M. M., Venema, K., Ramasamy, U., ... de Vos, P. (2014). Toll-like receptor 2 activation by 2-&1-fructans protects barrier function of T84 human intestinal epithelial cells in a chain length-dependent manner. *The Journal of Nutrition*, 144(7), 1002–1008. <https://doi.org/10.3945/jn.114.191643>.
- Vogt, L., Ramasamy, U., Meyer, D., Pullens, G., Venema, K., Faas, M. M., ... de Vos, P. (2013). Immune modulation by different types of  $\beta$ 2 $\rightarrow$ 1-Fructans is toll-like receptor dependent. *PLoS One*, 8(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068367>.
- Wada, T., Sugatani, J., Terada, E., Ohguchi, M., & Miwa, M. (2005). Physicochemical characterization and biological effects of inulin enzymatically synthesized from sucrose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1246–1253. <https://doi.org/10.1021/jf048711u>.
- Watzl, B., Gírrbach, S., & Roller, M. (2005). Inulin, oligofructose and immunomodulation. *The British Journal of Nutrition*, 93(S1), S49. <https://doi.org/10.1079/BJN20041357>.
- Wolff, D., Czaplá, S., Heyer, A. G., Radosta, S., Mischnick, P., & Springer, J. (2000). Globular shape of high molar mass inulin revealed by static light scattering and viscometry. *Polymer*, 41, 0–7. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00168-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00168-3).
- Wongsagonsup, R., Shobsngob, S., Oonkhanond, B., & Varavinit, S. (2005). Zeta potential and pasting properties of phosphorylated or crosslinked rice starches. *Starch/Stärke*, 57(1), 32–37. <https://doi.org/10.1002/star.200400311>.
- Zhang, L., Li, Y., Wang, C., Li, G., Zhao, Y., & Yang, Y. (2014). Synthesis of methyl-prednisolone loaded ibuprofen modified inulin based nanoparticles and their application for drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 42, 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.025>.



# Association of the Promoter Methylation and the rs12917 Polymorphism of *MGMT* with Formation of DNA Bulky Adducts and the Risk of Lung Cancer in Mexican Mestizo Population

Ollin Celeste Martínez-Ramírez,<sup>1</sup> Rebeca Pérez-Morales,<sup>2</sup> Clementina Castro-Hernández,<sup>3</sup> Maria Eugenia Gonsebatt,<sup>3</sup> Leonora Casas-Ávila,<sup>4</sup> Margarita Valdés-Flores,<sup>4</sup> Pavel Petrosyan,<sup>3</sup> Valeria Ponce de León-Suárez<sup>4</sup>, and Julieta Rubio<sup>3</sup>

O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) is an enzyme that repairs the DNA damage caused by the tobacco habit, and low activity of this enzyme has been associated with a risk of lung cancer (LC). Our objective was to determine the association of the promoter methylation and the rs12917 polymorphism of *MGMT* with formation of DNA bulky adducts and the risk of LC in the Mexican Mestizo population. In this study are included 431 subjects. High-resolution melting analysis was used to determine the polymorphism *MGMT* rs12917 and methylation levels. DNA bulky adducts were determined by <sup>32</sup>P-postlabeling. Our results showed that *MGMT* rs12917 and higher levels of methylation in the *MGMT* promoter are associated with the risk of LC. The levels of adducts are related with the phe/phe genotype and, only in the cases group, with the hypermethylation (>50%) of *MGMT*; however, this last association was not statistically significant.

**Keywords:** lung cancer, epigenetic, polymorphism, MGMT, adducts

## Introduction

LUNG CANCER (LC) IS THE SECOND CAUSE of cancer deaths worldwide including Mexico (Ferlay *et al.*, 2015). Factors such as age, gender, genetic background, life style, and ethnicity are associated with the risk of developing this cancer. However, the reported main risk factor associated with the etiology of LC is a tobacco habit, since ~85% of LC patients are or were smokers (Ferlay *et al.*, 2015).

This carcinogenic potential of tobacco is due because it contains >20 carcinogenic compounds, of these, the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) is most often associated with the etiology of LC (Liu and Gerson, 2006). NNK requires metabolic activation to exert its carcinogenic effects; this depends on the relative efficiency of the enzymes involved in the activation and elimination of the mutagenic metabolites and repair of the DNA damage.

The major metabolic activation pathways of NNK and its main produced metabolite is the 4-(methylnitrosamino)-1-

(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL), which leads to the formation of two types of DNA methyl adducts, 7-methylguanine and O<sup>6</sup>-methylguanine (MeG), this being one of the promutagenic DNA adducts that causes [G:C]A:T mutations during DNA replication (Kaina *et al.*, 2007; Ensminger *et al.*, 2014), MeG can be removed only by the enzyme O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) (Pegg, 2000). This enzyme repairs alkylation adducts but irreversibly inactivates MGMT itself in the process. In the absence of active MGMT, MeG forms MeG/T mismatches during replication (Sabharwal and Middleton, 2006; Kaina *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009).

The low activity of the MGMT enzyme has been associated with risk to develop different types of cancer, including LC. Interindividual variation in MGMT activity may be attributable to allelic variants in the *MGMT* gene (Margison *et al.*, 2005). Three common nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs), rs12917, rs2308321, and rs2308327, have been reported in the coding region of MGMT (Kaur *et al.*, 2000; Egyházi *et al.*, 2002). These polymorphisms may affect the primary structure, expression, and DNA repair

<sup>1</sup>Facultad de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico.

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

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico.

<sup>4</sup>Departamento de Genética, Instituto Nacional de Rehabilitación, Ciudad de México, Mexico.

activity of MGMT (Hill *et al.*, 2005; Pegg *et al.*, 2007; Kounai *et al.*, 2014). Specifically the C>T polymorphism may affect Zn<sup>2+</sup> binding to MGMT, this is known to enhance MGMT activity (Zhang *et al.*, 2003), and also has been associated with increased risk for various cancers (Shen *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2007), including LC, possibly caused by the formation of adducts, as Molina *et al.* (2013) demonstrated an association between MGMT84 rs12917 with bulky DNA adduct levels.

In contrast, also aberrant methylation in the promoter region of the MGMT gene is implicated in a mechanism of gene silencing leading to tumorigenesis and has been frequently found in lung and several other tumor types (Esteller *et al.*, 1999; Tranah *et al.*, 2006).

The relationship between germline genetic variations and somatic epigenetic events is an emerging area of investigation. Certainly, germline genetic variants are quite common in the general population, in contrast to heritable germline epimutations that are rare events (Ogino *et al.*, 2007). A possible relationship has been shown between germline SNPs and loss of methylation in an imprinted MGMT gene (Ogino *et al.*, 2007). Recently, a study found in LC a weak association between a promoter SNP and the methylation reporter of the MGMT gene (Leng *et al.*, 2011).

The objective of this study was to determine the relationship between promoter methylation and L84F polymorphism of MGMT with the risk of LC in a sample of Mexican Mestizo population, and whether this polymorphism and the hypermethylation of MGMT could have some relationship with the formation of adducts in the DNA, leading to LC.

## Materials and Methods

### Retrospective study of cases and controls

We included 431 subjects, 237 controls (without diagnosis of LC) and 194 cases (with primary LC diagnosis).

Subjects with LC diagnosis (cases), who attended in 2011–2014 to the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), “Ismael Cosío Villegas” in Mexico City, were evaluated histologically with specimens from lung biopsy or resection; professional pathologists diagnosed the primary LC. These cases were >30 years old (mean age 58.0 ± 13.8 years old).

Control samples (subjects without diagnosis of LC) were collected from blood donors between 2006 and 2007, from the Hospital “20 de Noviembre” in Mexico City (mean age 49.8 ± 14.3 years old).

Cases and controls were unrelated subjects, born in Mexico, with parents and grandparents also born in Mexico. Informed consent was obtained from all participants.

The research protocol was approved by the Bioethics Committees of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and the INER, “Ismael Cosío Villegas” (Mexico City). The Hospital “20 de Noviembre” gave permission to use in this study the collected buffy coat of blood bank samples.

### DNA extraction

DNA samples used for the genotyping analyses were extracted from blood samples collected and stored at –20°C

until used. Mononuclear white cells and the genomic DNA were isolated as described by Lahiri and Numberger (1991).

### Genotyping

High-resolution melting (HRM) analysis was used to determine the polymorphism MGMT rs12917. The sequences of primers were as follows: 5'-CTGCTAATGCCTATTTCC-3' (forward primer) and 5'-AACACCGCAGATGGCTTAGT-3' (reverse primer). PCR consisted of initial denaturing at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturing at 94°C for 20 s, annealing at 62°C for 20 s and extension at 72°C for 20 s, and a final extension at 72°C for 10 min. HRM analysis was performed using a 80–90°C temperature range, with 0.1°C increments. PCR amplifications using EvaGreen were carried out in 10 µL volumes containing 2 × HRM master mix (contains HotStar Taq Plus DNA Polymerase, EvaGreen dye, 10 µM each primer, and 10 ng template DNA). PCR and subsequent melt curve analysis were carried out using the Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). The increase and decrease in fluorescence of EvaGreen during PCR and the melt phase were acquired on the HRM of the Rotor-Gene.

### Analysis of methylation

Approximately 1 µg of DNA extracted from mononuclear white cells was sodium bisulfite modified using an EZ DNA Methylation Kit™ (Zymo Research, Orange, CA), according to the manufacturer's instructions. Methylation-specific PCR was performed with primers specific for either methylated or the modified unmethylated DNA. Primer sequences for the methylated reaction were 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3' (forward primer) and 5'-GCACTCTTCCGAAAACGA AACG-3' (reverse primer), and for the unmethylated reaction they were 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3' (forward primer) and 5'-AACTCCACACTCTTCCAAA AACAAAACA-3' (reverse primer). The annealing temperature was 59°C. HRM analysis was performed.

CpGenome universal methylated DNA (Merck millipore) was used as a positive control for methylated MGMT, and CpGenome universal unmethylated DNA (Merck millipore) was used as a control for unmethylated MGMT. Template-free H<sub>2</sub>O was included as a negative control for the PCR. Standard dilution series of 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, and 0% methylation levels were prepared by dilutions of the fully methylated DNA into unmethylated DNA.

The resulting PCR products were extracted from agarose gels using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany) and sequenced with ABI BigDye using an ABI 310 sequencer (Applied Biosystems). The sequences obtained were compared with sequences from NCBI database using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to confirm amplicon identities.

### DNA adducts analysis

DNA adducts were analyzed by <sup>32</sup>P-postlabeling (Phillips *et al.*, 2000). In brief, 4 mg of DNA was digested overnight by micrococcal endonuclease and spleen phosphodiesterase, and enrichment for DNA adducts was obtained by nuclease P1 treatment. Resulting DNA was labeled with 50 mCi <sup>32</sup>P-gATP per reaction and DNA adducts were resolved by multidirectional thin layer chromatography (TLC) on 10 cm × 10 cm

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF HEALTHY CONTROLS AND PATIENTS WITH LUNG CANCER

	Cases	Controls	OR (95% CI)	p
Subjects	194	237		
Female	90 (46.3%)	150 (63.2%)		0.01 <sup>a</sup>
Men	104 (53.6%)	87 (36.7%)		
Age (years), mean $\pm$ SD	50.2 $\pm$ 13.05	49.1 $\pm$ 14.56		
Smoking (%)				
No	57 (29.3)	130 (54.8)		
Yes	137 (70.6)	107 (45.1)	1.97 (1.32–2.95)	0.001 <sup>a</sup>

Fisher's exact test.

<sup>a</sup>Significant values.

CI, confidence interval; OR, odds ratio.

polyethylenimine (PEI)-cellulose plates. Solvent systems used for TLC were according to Salcido-Neyoy *et al.* (2015).

### Statistical analyses

Epidemiological risk factors and risk of developing LC were examined using Fisher's exact tests. The tests were carried out using GraphPad Prism 5 software.

To explore a possible association between LC risk and the polymorphism, an unconditional logistic regression analyses to calculate the crude odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals,  $\chi^2$  tests, and Fisher's exact tests were performed in GraphPad-Prism 5. Groups having the lowest risk were used as reference value, assuming a biological activity gradient (codominant model).

Repeated-measures analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the relationship between DNA adducts and tobacco habit, *MGMT* methylation and rs12917 polymorphism. A criterion of  $p \leq 0.05$  was used to determine statistical significance. ANOVAs were performed with the Statistical Package for Social Sciences (SPSS-PC; SPSS, Inc., Chicago, IL).

### Results

The characteristics of the population included in this study are displayed in Table 1, which shows that cases and controls have a mean age of  $\sim 50$  years and for the cases group there are a greater number of women than in the control group.

With respect to smoking history, a significant difference was found between cases (70.6%) and controls (45.1%), highlighting the importance of the smoking history in the etiology of LC.

In the analysis of association between polymorphisms and the risk of LC (Table 2), we found positive associations with homozygous mutants *MGMT* T/T (OR=2.04). As in both groups, gender and smoking habit were statistically different and, therefore, could have influence in the results of associations with the risk of LC, we decided to make an analysis of logistic regression to adjust data with these two variables and then we found that the variant heterozygous was negatively associated (OR=0.75) and the variant homozygous mutant had a positive relationship with the risk of developing LC (OR=1.30).

With respect to the *MGMT* promoter methylation, Table 3 shows statistically significant association with the risk of LC when DNA methylation is  $>50\%$ .

Table 4 shows the association of genotypes and the percentage of the methylation of *MGMT* promoter with the risk of LC; we found a negative association of heterozygosity with risk of LC when the *MGMT* gene promoter is 75% and 100% methylated.

As for the adduct levels, we separated them according to tobacco habit (Fig. 1) and found higher levels of adducts in smokers; however, this difference was not statistically significant.

Figure 2 shows that in the control group, the levels of adducts in smokers and nonsmokers are not related to the genotype of the *MGMT* rs12917 polymorphism. Interestingly, in smokers from cases group, we found there are a statistically significant levels in the T/T genotype in comparison with the C/C and C/T genotypes.

In contrast, the levels of adducts in relation to methylation showed higher levels when the subjects were smokers and showed hypermethylation of the *MGMT* gene; however, there were no statistically significant differences between cases and controls (Fig. 3).

TABLE 2. ASSOCIATION OF GENETIC POLYMORPHISMS WITH LUNG CANCER

Genotype	Cases, n (%)	Controls, n (%)	Unadjusted		Adjusted for gender and smoking	
			OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
<i>MGMT</i> rs12917 C>T						
C/C	105 (54.1)	129 (54.4)	1.0 <sup>a</sup>		1.0 <sup>a</sup>	
C/T	44 (22.6)	81 (34.1)	0.66 (0.42–1.04)	0.09	0.75 (0.43–1.20)	0.05
T/T	45 (23.1)	27 (11.3)	2.04 (1.19–3.52)	0.01 <sup>b</sup>	1.30 (0.22–1.89)	0.03 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Reference value.

<sup>b</sup>Significant values.



TABLE 3. ASSOCIATION OF THE PERCENTAGE OF METHYLATION WITH THE RISK OF LUNG CANCER

	Cases, n (%)	Controls, n (%)	OR (95% CI)	p
<i>MGMT</i> methylation				
0%	17 (8.7)	53 (22.3)	1.0 <sup>a</sup>	
10%	19 (9.7)	64 (27.0)	0.92 (0.43–1.95)	0.85
25%	20 (10.3)	41 (17.2)	1.52 (0.70–3.26)	0.33
50%	40 (20.6)	32 (13.5)	3.89 (1.90–7.98)	0.0002 <sup>b</sup>
75%	52 (26.8)	28 (11.8)	5.79 (2.83–11.82)	<0.0001 <sup>b</sup>
100%	46 (23.7)	19 (8.0)	7.54 (3.51–16.21)	<0.0001 <sup>b</sup>
Methylation group of <i>MGMT</i>				
<50%	56 (28.8)	158 (66.6)	1.0 <sup>a</sup>	
>50%	138 (71.1)	79 (33.3)	4.92 (3.26–7.43)	<0.0001 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Reference value.

<sup>b</sup>Significant values.

## Discussion

This study included 431 subjects, 194 cases and 237 controls, and, as reported in many other studies, we also found a very clear relationship between LC and smoking habit, as our cases group had significantly greater number of smokers than the control group, showing a risk near to two times greater to develop LC in smokers compared with

TABLE 4. ASSOCIATION OF GENOTYPES AND PERCENTAGE OF *MGMT* PROMOTER METHYLATION WITH THE RISK OF LUNG CANCER

Percentage of methylation				
Genotype	Cases	Controls	OR (95% CI)	p
Methylation 0%				
C/C	8	34	1.0 <sup>a</sup>	
C/T	5	14	1.51 (0.42–5.45) <sup>b</sup>	0.51
T/T	4	5	3.4 (0.74–15.6) <sup>b</sup>	0.18
Methylation 10%				
C/C	15	46	1.0 <sup>a</sup>	
C/T	3	14	0.65 (0.16–2.60) <sup>b</sup>	0.74
T/T	1	4	0.76 (0.07–7.40) <sup>b</sup>	1.00
Methylation 25%				
C/C	12	23	1.0 <sup>a</sup>	
C/T	6	15	0.76 (0.23–2.48) <sup>b</sup>	0.77
T/T	2	3	1.27 (0.18–8.72) <sup>b</sup>	1.00
Methylation 50%				
C/C	22	16	1.0 <sup>a</sup>	
C/T	8	15	0.38 (0.13–1.13) <sup>b</sup>	0.11
T/T	10	1	7.27 (0.84–62.7) <sup>b</sup>	0.07
Methylation 75%				
C/C	27	7	1.0 <sup>a</sup>	
C/T	10	18	0.14 (0.04–0.44) <sup>b</sup>	0.0007 <sup>c</sup>
T/T	15	3	1.29 (0.29–5.76) <sup>b</sup>	1.00
Methylation 100%				
C/C	21	3	1.0 <sup>a</sup>	
C/T	12	5	0.34 (0.06–1.69) <sup>b</sup>	0.24
T/T	13	11	0.16 (0.03–0.72) <sup>b</sup>	0.02 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Reference values.

<sup>b</sup>Fisher's exact test.

<sup>c</sup>Significant values.

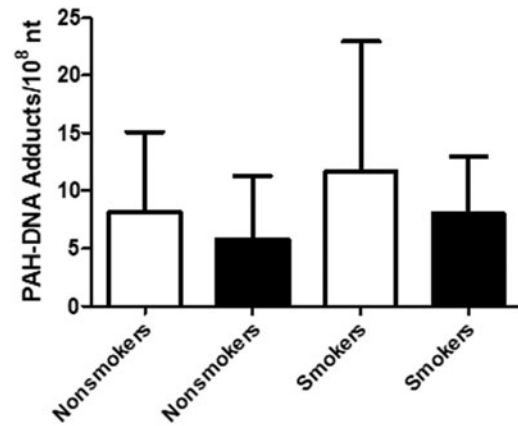


FIG. 1. Detection of PAH-DNA adducts, according to the Phillips *et al.*, 2000, protocol. Data represent the mean  $\pm$  SD. White bars correspond to controls, black bars correspond to cases. One-way ANOVA. ANOVA, analysis of variance; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon.

nonsmokers (Subramanian and Govindan, 2007; Thompson *et al.*, 2012).

We found that homozygous mutants *MGMT* T/T are associated with risk of LC; this could be related to DNA repair capability and enzymatic activity, thereby leading to the risk for breast cancer and LC. (Lu *et al.*, 2015). When we adjust the data by gender and smoking habit, we find a negative association with heterozygous genotypes, this association could be explained based on the reports that propose that the heterozygosity has a significant effect in reducing the risk for developing some diseases, such as cancer; this effect is termed “Heterozygous advantage,” which refers that the heterozygous genotype having a copy of each allele has several advantages over the wild-type homozygous, and the nonwild homozygous type genotypes have not (Sellis *et al.*, 2011).

In reference to the association of rs12917 polymorphism and the percentage of methylation of *MGMT*, it is important

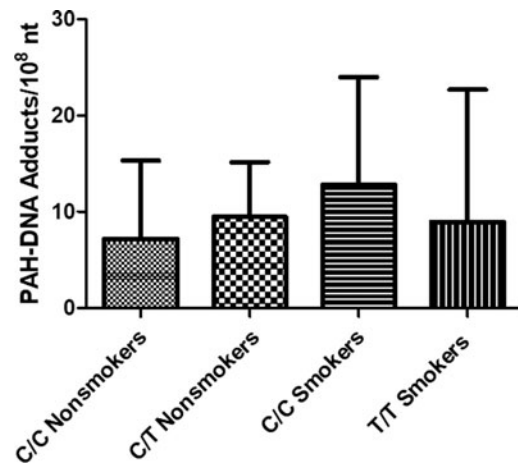
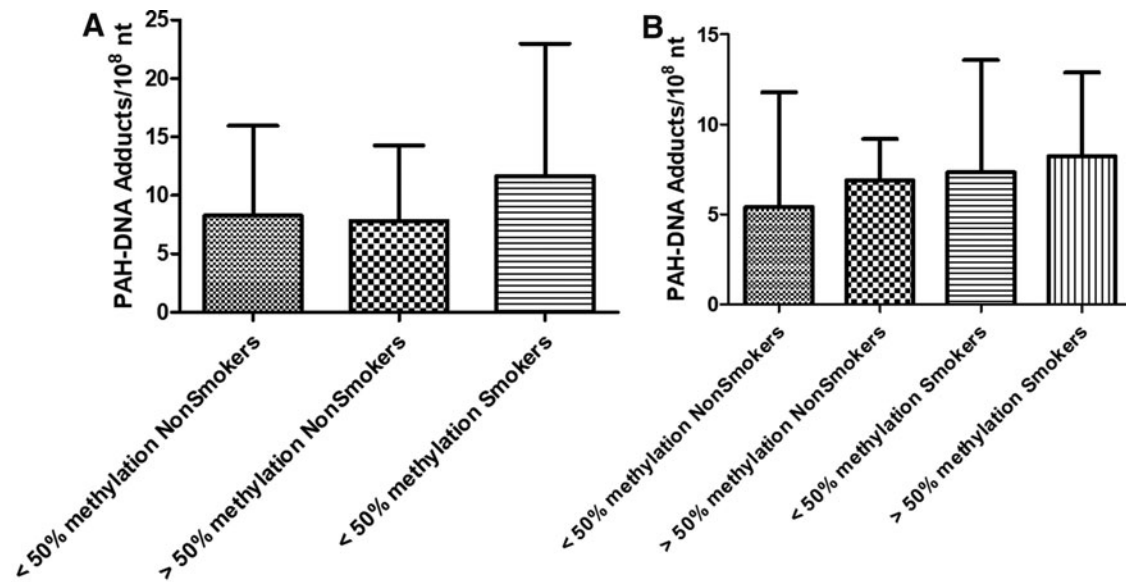


FIG. 2. Association of genotypes of *MGMT* rs12917 in smokers and nonsmokers with PAH-DNA adduct levels. One-way ANOVA.



**FIG. 3.** Association of percentage of *MGMT* promoter methylation in controls (A) and cases (B) with PAH-DNA adduct levels. One-way ANOVA.

to highlight that the relationship between allelic variants and somatic epigenetic events has been an emerging area of investigation. Certainly, genetic variants are quite common in the general population, in contrast to epigenetics marks. In reports preview, a possible relationship between allelic variants and methylation in some genes (*IGF2* and *MLH1*) has been shown, without statistical significance. However, there has been no compelling evidence for the relationship between a polymorphism and promoter methylation (and silencing) of the same gene (Murrell *et al.*, 2004; Hitchins *et al.*, 2007).

*MGMT* promoter methylation is very common in LC; however, the results about the association between the level of *MGMT* methylation and LC were different in our study as we found positive association between *MGMT* and LC in the Mexican Mestizo population.

On the other hand, the *MGMT* gene dysfunction due to the promoter hypermethylation could generate DNA damage through the formation of adducts. We determined the formation of adducts in the cases group and in control group and we separated both groups in smokers and nonsmokers, this is because Molina *et al.* (2013) showed that the adducts are significantly related to the tobacco habit.

We found higher levels of adducts in smoker patients with LC with the *MGMT* Phe/Phe genotype, these results agree with what was previously reported in healthy individuals and reaffirm the relationship of the *MGMT* rs12917 (C>T) polymorphism with increased mutation frequency in the lymphocytes of smokers compared with smokers carrying the wild-type allele. In contrast, we found higher levels of adducts in smoking cases and control groups, regardless of the *MGMT* methylation percentage.

This may be due to the aberrant methylation of promoter regions in DNA repair genes, which is a key event in the formation and progression of cancer and epigenetic change of CpG islands in the gene promoter region (Zhang *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2013).

## Conclusions

In this study, we provide evidence that in a sample of Mexican Mestizo population, the *MGMT* gene is associated with the etiology of LC because there is a positive association with the rs12917 polymorphism and the hypermethylation of gene promoter the *MGMT* with the risk of LC. In addition, the levels of adducts were related with the T/T genotype and hypermethylation (>50%) of *MGMT* in cases, this last association was not statistically significant.

Our results contribute to explain the high frequency of LC in the Mexican Mestizo population; however, this information must be verified in future studies with a greater number of samples to corroborate the association of methylation with DNA bulky adduct levels.

## Acknowledgments

This study was supported, in part, by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, IN210111, and IN208314 to J.R.), Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP, DSA/103.5/15/3073 to O.C.M.-R.), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, CB-2012/178860 to J.R.). We thank all our blood donors for their valuable contribution to this project and David Rico for computer support.

## Ethical Approval

This work was performed under the approval of the Ethics Committees of Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, and Instituto Nacional de Cancerología (INCan).

## Authors' Contributions

Study conception and design were carried out by O.C.M.-R., P.P., M.E.G., C.C.-H., and J.R. Support for access to

biological samples from patients was provided by M.V.-F. Analysis and interpretation of data were carried out by O.C.M.-R., R.P.-M., and J.R. Drafting of the article was performed by O.C.M.-R. and J.R. Critical revision of the article was carried out by R.P.-M., M.E.G., V.P.L.-S., C.C.-H., L.C.-Á., M.V.-F., and J.R.

### Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Egyházi, S., Ma, S., Smoczynski, K., Hansson, J., Platz, A., and Ringborg, U. (2002). Novel O6-methylguanine-DNA methyltransferase SNPs: a frequency comparison of patients with familial melanoma and healthy individuals in Sweden. *Hum Mutat* **20**, 408–409.
- Ensminger, M., Iloff, L., Ebel, C., Nikolova, T., Kaina, B., and Löbrich, M. (2014). DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. *J Cell Biol* **206**, 29–43.
- Esteller, M., Hamilton, S.R., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (1999). Advances in brief inactivation of the DNA repair gene O6-Methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia 1. *Cancer Res* **59**, 793–797.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., *et al.* (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359–E386.
- Gu, C., Lu, J., Cui, T., Lu, C., Shi, H., Xu, W., *et al.* (2013). Association between MGMT promoter methylation and non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *PLoS One* **8**, 1–9.
- Hall, J., Hashibe, M., Boffetta, P., Gaborieau, V., Moullan, N., Chabrier, A., *et al.* (2007). The association of sequence variants in DNA repair and cell cycle genes with cancers of the upper aerodigestive tract. *Carcinogenesis* **28**, 665–671.
- Han, J., Hankinson, S.E., and De Vivo, I. (2006). Polymorphisms in O6-methylguanine DNA methyltransferase and endometrial cancer risk. *Carcinogenesis* **27**, 2281–2285.
- Hill, C.E., Wickliffe, J.K., Wolfe, K.J., Kinslow, C.J., Lopez, M.S., and Abdel-Rahman, S.Z. (2005). The L84F and the I143V polymorphisms in the O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene increase human sensitivity to the genotoxic effects of the tobacco-specific nitrosamine carcinogen NNK. *Pharmacogenet Genomics* **15**, 571–578.
- Hitchins, M.P., Wong, J.J., Suthers, G., Suter, C.M., Martin, D.I., Hawkins, N.J., *et al.* (2007). Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* **356**, 697–705.
- Huang, J., Ye, F., Chen, H., Lu, W., and Xie, X. (2007). Amino acid substitution polymorphisms of the DNA repair gene MGMT and the susceptibility to cervical carcinoma. *Carcinogenesis* **28**, 1314–1322.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S., and Roos, W.P. (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair* **6**, 1079–1099.
- Kaur, T.B., Travaline, J.M., Gaughan, J.P., Richie, J.P., Stellman, S.D., and Lazarus, P. (2000). Role of polymorphisms in codons 143 and 160 of the O6-alkylguanine DNA alkyltransferase gene in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 339–342.
- Kokunai, Y., Tsuji, M., Ito, Y., Kurokawa, T., Otsuki, Y., and Moriwaki, S. (2014). Immunohistochemical analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human melanoma in comparison with skin squamous cell carcinoma. *Med Mol Morphol* **47**, 8–13.
- Lahiri, D.K., and Numberger, J.I. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* **19**, 5444.
- Leng, S., Bernauer, A.M., Hong, C., Do, K.C., Yingling, C.M., Flores, K.G., *et al.* (2011). The A/G allele of Rs16906252 predicts for MGMT methylation and is selectively silenced in premalignant lesions from smokers and in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* **17**, 2014–2023.
- Liu, Lili, and Stanton L. Gerson. (2006). Targeted modulation of MGMT: clinical implications. *Clin Cancer Res* **12**, 328–331.
- Lu, Y., Cao, M., Gao, K., Jiang, J., and Shi, X. (2015). The role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase polymorphisms in colorectal cancer susceptibility: a meta analysis. *Int J Clin Exp Med* **8**, 791–799.
- Margison, G.P., Heighway, J., Pearson, S., McGown, G., Thorncroft, M.R., Watson, A.J., *et al.* (2005). Quantitative trait locus analysis reveals two intragenic sites that influence O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* **26**, 1473–1480.
- Molina, E., Pérez-Morales, R., Rubio, J., Petrosyan, P., Hernández Cadena, L., Arlt, V.M., *et al.* (2013). The GSTM1null (deletion) and MGMT84 Rs12917 (Phe/Phe) haplotype are associated with bulky DNA adduct levels in human leukocytes. *Mutat Res* **758**, 62–68.
- Murrell, A., Heeson, S., and Reik, W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet* **36**, 889–893.
- Ogino, S., Hazra, A., Tranah, G.J., Kirkner, G.J., Kawasaki, T., Nosho, K., *et al.* (2007). MGMT germline polymorphism is associated with somatic MGMT promoter methylation and gene silencing in colorectal cancer. *Carcinogenesis* **28**, 1985–1990.
- Pegg, A.E. (2000). Repair of O6-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* **462**, 83–100.
- Pegg, A.E., Fang, Q., and Loktionova, N.A. (2007). Human variants of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *DNA Repair* **6**, 1071–1078.
- Phillips, D.H., Farmer, P.B., Beland, F.A., Nath, R.G., Poirier, M.C., Reddy, M.V., *et al.* (2000). Methods of DNA adduct determination and their application to testing methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environ Mol Mutagen* **2280**, 222–233.
- Sabharwal, A., and Middleton, M.R. (2006). Exploiting the role of O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) in cancer therapy. *Curr Opin Pharmacol* **6**, 355–363.
- Salcido-Neyoy, M.E., Sánchez-Pérez, Y., Osornio-Vargas, A.R., Gonsbatt, M.E., Meléndez-Zajgla, J., Morales-Bárcenas, R., *et al.* (2015). Induction of C-Jun by air particulate matter (PM10) of Mexico City: participation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Pollut* **203**, 175–182.
- Sellis, D., Callahan, B.J., Petrov, D.A., and Messer, P.W. (2011). Heterozygote advantage as a natural consequence of adaptation in diploids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20666–20671.
- Sharma, S., Salehi, F., Scheithauer, B.W., Rotondo, F., Syro, L.V., and Kovacs, K. (2009). Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res* **29**, 3759–3768.

- Shen, J., Terry, M.B., Gammon, M.D., Gaudet, M.M., Teitelbaum, S.L., Eng, S.M., et al. (2005). MGMT genotype modulates the associations between cigarette smoking, dietary antioxidants and breast cancer risk. *Carcinogenesis* **26**, 2131–2137.
- Subramanian J, Govindan R. (2007). Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* **25**, 561–570.
- Thompson, C.A., Waldhor, T., Schernhammer, E.S., Hackl, M., Vutuc, C., and Haidinger, G. (2012). Smoking and lung cancer: current trends in Austria. *Wien Klin Wochenschr* **124**, 493–499.
- Tranah, G.J., Bugni, J., Giovannucci, E., Ma, J., Fuchs, C., Hines, L., et al. (2006). O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase Leu84Phe and Ile143Val polymorphisms and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study and Physicians' Health Study (United States). *Cancer Causes Control* **17**, 721–731.
- Zhang, Y.-J., Chen, Y., Ahsan, H., Lunn, R.M., Lee, P.H., Chen, C.J., et al. (2003). Inactivation of the DNA repair gene O<sup>6</sup>-methylguanine-dna methyltransferase by promoter hypermethylation and its relationship to aflatoxin B1-DNA adducts and p53 mutation in hepatocellular carcinoma. *J Cancer* **103**, 440–444.

Address correspondence to:

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

*E-mail: juruli@unam.mx*

Received for publication November 7, 2018; received in revised form December 21, 2018; accepted December 21, 2018.



# *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101, and *ADIPOQ* rs2241766 and 1501299 Polymorphisms Are Associated With Obesity and Chemotherapy Response in Mexican Women With Breast Cancer

Alejandra Méndez-Hernández,<sup>1</sup> Martha Patricia Gallegos-Arreola,<sup>2</sup> Hortensia Moreno-Macías,<sup>3</sup> Jorge Espinosa Fematt,<sup>1</sup> Rebeca Pérez-Morales<sup>4</sup>

## Abstract

**Obesity plays a major role in the pathogenesis of breast cancer. The aim of this study was to investigate polymorphisms of *LEP*, *LEPR* and *ADIPOQ* genes in 177 Mexican women with primary breast cancer, and the response to treatment. We found a direct association between the polymorphisms with overweight/obesity, and these genotypes affected the response to chemotherapeutic treatment.**

**Background:** Obesity plays a major role in the pathogenesis of breast cancer. Leptin (*LEP*) and adiponectin (*ADIPOQ*) are important in the regulation of adipose tissue. The response to cancer treatment depends on the histological and molecular tumor type, clinical stage, and genetic variability that might promote carcinogenic development. The aim of this study was to investigate the association between overweight/obesity and polymorphisms in the *LEP* (rs7799039), *LEP* receptor (*LEPR*; rs1137101), and *ADIPOQ* genes (rs2241766, rs1501299) with the response to breast cancer treatment in Mexican women. **Patients and Methods:** A sample of 177 patients with primary breast cancer (stage I-III) and who received neoadjuvant therapy were included. Polymorphisms were genotyped and their serum *LEP* concentrations (n = 59) were quantified. **Results:** The patients' median age was 53.1 years, the frequency of overweight and obesity was 57 and 84 patients, respectively, 117 were postmenopausal, and 64 of the patients did not respond to chemotherapy. An association of the *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101, and *ADIPOQ* rs1501299 polymorphisms with overweight/obesity was found. The patients who did not respond to treatment were more frequently obese, at clinical stage III, had metastases, and high levels of glucose. Moreover, in samples that were positive for estrogen receptor, higher levels of *LEP* were found, and in wild type genotypes for *LEP* rs7799039 and *LEPR* rs1137101. **Conclusion:** There was a direct association between the polymorphisms in *LEP* rs7799039 and *ADIPOQ* rs1501299 with overweight/obesity, and these genotypes affected the response to chemotherapeutic treatment, suggesting that an obesogenic microenvironment is more favorable for tumoral progression.

*Clinical Breast Cancer*, Vol. 17, No. 6, 453-62 © 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Adiponectin, Breast cancer, Leptin, Overweight, Treatment

## Introduction

Breast cancer is the most common invasive cancer diagnosed in women worldwide, representing 11.9% (1.76 million) of all such

new cancer cases and 6.7% (521,000) of such deaths in 2012. In Mexico, its incidence has increased in the past 6 years, and it is the most frequent cancer in women (24.8%) and one of the leading

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

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética Molecular, División de Medicina Molecular, Centro de Investigación Biomédica de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México

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

<sup>4</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Filadelfia, Gómez Palacio, Durango, México

Submitted: Sep 10, 2016; Revised: Feb 17, 2017; Accepted: Mar 14, 2017; Epub: Mar 22, 2017

Address for correspondence: Rebeca Pérez-Morales, PhD, Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, Av Artículo 123 s/n Fracc, Filadelfia, CP 35010 Gómez Palacio, Durango, México

E-mail contact: [rebecapms@ujed.mx](mailto:rebecapms@ujed.mx)

# LEP, LEPR, ADIPOQ Polymorphisms and Chemotherapy Response

causes of cancer deaths in women (14.4%), with a greater percentage even than cervical cancer (11.9%).<sup>1,2</sup>

Currently, neoadjuvant therapy is the standard treatment for patients with locally advanced and/or inoperable breast cancer, and it provides clinical disease relief to patients who might be candidates for conservative surgery while allowing the assessment of the tumor sensitivity to chemotherapy.<sup>3</sup> The response to treatment depends on the histological and molecular type, clinical stage, and genetic variability of the various biomarkers that are involved in the bioavailability and biotransformation of drugs. A positive response is determined by imaging, tumor serology, and clinical evidence and is classified as either a pathological complete response, in patients for whom there is no evidence of tumor or affected lymph nodes, or as a partial response (PR), which is characterized by a relative decrease in tumor size (< 30%). Progressive disease (PD) is characterized by a 20% relative increase in the size of the lesion, and stable disease (SD) is for cases that cannot be evaluated as PD or SD when the baseline tumor is considered.<sup>4</sup>

Recently highlighting the role of obesity in the treatment response, Parekh et al conducted a meta-analysis of 47 studies and reported a higher incidence of breast cancer in obese women, who also had poorer prognoses than did nonobese patients, especially in postmenopausal women diagnosed at stage III and IV.<sup>5</sup> Obesity was associated with an increase in cancer mortality, decreased quality of life, and a limited response to treatment.<sup>6</sup>

It has been reported that adipose tissue plays an important role in endocrine control by secreting hormones that might influence the pathophysiology of cancer, including leptin (LEP) and adiponectin (ADIPOQ). An imbalance of these adipocytokines promotes the activation of signaling pathways that induce proliferation, angiogenesis, and inflammation. Obesity can thus be considered a source of chronic inflammation.<sup>7</sup>

Leptin is a hormone that is produced in white adipose tissue. Its main function is to control the appetite and energy balance and plasma levels of LEP have shown a positive correlation with body mass index (BMI). LEP is encoded by the *LEP* gene and is located on chromosome 7q31.3. Some polymorphisms in the gene can produce a phenotype of morbid obesity in mice.<sup>8,9</sup> *LEP* human polymorphism rs7799039 (G-2548A) has been associated with high levels of LEP, although it is independent of BMI. Individuals with genotype *LEP*-2548 A/A showed higher levels of LEP and increased mRNA expression in their adipose tissue compared with the genotype *LEP*-2548 G/G. In a neoplastic context, genotype *LEP*-2548 A/A has been associated with an increased risk of non-Hodgkin lymphoma. *LEP*-2548 G/A and *LEP*-2548 A/A have been associated with an increased risk of non-small-cell lung cancer and breast carcinoma. In addition, the genotype *LEP*-2548G/A correlates with larger breast tumors at diagnosis, and shorter disease-free periods.<sup>10-12</sup>

The central and peripheral effects of LEP are mediated through the LEP receptor (LEPR) located on the cell surface. The LEPR is encoded by the *LEPR* gene located on chromosome 1p21. Several polymorphisms of the gene have been described, including rs1137101, which produces a substitution of Q223R in the LEP binding site. This change of a neutral to a positively charged amino acid affects the signaling pathway of the receptor and is associated with high circulating levels of LEP. It has also been reported that the homozygous G allele (R223R) is associated with variations in the

activity of the ligand, insulin resistance, and an increased risk of the breast cancer progression (odds ratio [OR], 6.840; 95% confidence interval [CI], 1.62-5.64;  $P < .001$ ).<sup>13</sup>

Adiponectin is a 30-kDa protein that regulates energy metabolism in the body and is very abundant in the circulation of individuals of normal weight but is paradoxically reduced in the obese and negatively correlated with BMI, body fat, and serum LEP levels. It is expressed primarily in white adipose tissue, exerting anti-inflammatory, antidiabetic, and antiatherogenic functions. ADIPOQ plays an important role in the modulation of endothelial function and the suppression of angiogenesis. The cellular action of ADIPOQ is mediated by 2 main receptors, ADIPOQ receptors 1 and 2. Recent evidence suggests a link between low ADIPOQ levels and the progression of tumors.<sup>14,15</sup>

The *ADIPOQ* gene is highly polymorphic, with at least 620 variants reported. The variants that have been most studied for their association with cancer are single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs266729 (11365C > G), rs822395 (-4034A > C), rs822396 (-3964A > G), rs2241766 (45T > G), and rs1501299 (276G > T). The SNPs rs1501299 and rs2241766 are located in intron 2 and exon 2, respectively. Genotypes rs1501299 G/G and rs2241766 T/T are associated with decreased ADIPOQ levels, obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes, but their functional effects have not yet been characterized. Kaklamani et al reported the polymorphisms rs1501299 and rs2241799 as functionally promoting a decrease in serum ADIPOQ levels. These polymorphisms are associated with higher breast cancer risk in African American women (rs1501299 GG genotype; OR, 1.41; 95% CI, 1.08-1.83; and rs2241799 GG genotype; OR, 2.58; 95% CI, 0.81-8.25).<sup>16,17</sup>

There are several reports suggesting that obesity is a risk factor for cancer because of the reactive oxygen species generated by chronic inflammation. When a cancer is established, this inflammatory condition provides a microenvironment that is more favorable for proliferation and metastasis. In this study, we analyzed the response to neoadjuvant therapy in patients with breast cancer (overweight/obese and nonobese), considering several biochemical parameters and genetic factors that are associated with overweight and obesity.

## Patients and Methods

### Patients

A consecutive case study was designed, in which women with a recent diagnosis of primary breast cancer were included; a sample of 177 patients in clinical stages I to III who received a treatment regimen of FEC (5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide) were analyzed. The diagnosis was performed by oncologists and pathologists of Centro Médico de Occidente of Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) in Guadalajara City, Jalisco, México. Oncology sampling was done during the period from June 2012 to April 2014. Personal information and samples from each patient were obtained after signing the informed consent. The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the IMSS. The characteristics of the patients, and clinical and pathological data including age, risk factors, histological, and molecular characteristics of the tumor, anthropometric data, personal medical history, and family backgrounds were documented. The determination of some biochemical parameters were realized including fasting glucose. The evaluation of the treatment response was conducted by the

oncologist group, on the basis of Response Evaluation Criteria In Solid Tumors criteria. The patients were finally classified into 1 of 2 groups: pathologic complete response (pCR) or no response (NR).

### Genotyping

Peripheral blood from each patient was collected and DNA was extracted using the method reported by Miller et al.<sup>18</sup> Genotyping assays were performed using Taqman probes: C\_1328079\_10 for *LEP* rs7799039, C\_8722581\_10 for *LEPR* rs1137101, C\_497299\_10 for *ADIPOQ* rs1501299, and C\_26426077\_10 for *ADIPOQ* rs2241766. The results were analyzed using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Twenty percent of the samples, in each SNP, were randomly selected to genotype in duplicate. The concordance was 100% in all cases.

### Statistical Analysis

Quantitative variables were expressed as the mean and standard deviation. The allelic and genotypic frequencies were estimated using direct counting. Independence between categorical variables was evaluated using Pearson  $\chi^2$  test. Logistic regression models were adjusted for age, menopause status, and the molecular subtype of the tumor. The overweight/obesity variables were used to evaluate the association of genotypes with treatment response. To evaluate the influence of overweight/obesity as a mediating variable between SNPs and the response to treatment, a mediation analysis was performed, which consisted of a series of logistic regressions between the independent variable (SNPs), the mediating variable (overweight/obesity), and the dependent variable (response to treatment). All association analyses were performed using STATA software version 12 (Stata Corp). Statistical significance was established if the *P* value was  $\leq .05$  for all comparisons.

## Results

### Patient Characteristics

Patients were divided into 2 groups: pCR and NR. In the pCR group, the mean age was  $53.1 \pm 10.66$  years, and the mean BMI was  $29.42 \pm 5.29$ ; in the NR group, the mean age was  $52.75 \pm 13.99$  years, and the mean BMI was  $30.76 \pm 7.66$ . Stratifying the BMI data for each group, 71 patients in the pCR group had obesity, as did 13 in the NR group ( $P = .03$ ). No significant differences were found for the other risk factors of menopausal status, use of contraceptives, alcohol use, and smoking (Table 1).

Several patients had comorbidities such as hypertension and diabetes (48 patients), although there was no significant difference between the groups. However, the disparate frequencies of breast fibrosis or hysterectomy were significant, with 24 patients in the pCR and 10 patients in the NR group ( $P = .003$ ). Although a stage III diagnosis and metastasis occurred in a higher percentage of NR patients, they also showed a higher frequency of negative prognostic markers such as E-cadherin (e-Cad) and p53-positive as well as elevated serum glucose level (Table 1).

### Relation Between *LEP*, *LEPR*, and *ADIPOQ* Polymorphisms and Their Association With Treatment Response

There are several reports that associate obesity with a lack of response to treatment. In this study, we selected some

polymorphisms in genes involved in obesity and analyzed their association with chemotherapy response. The distribution of genotypes with *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101, *ADIPOQ* rs1501299, and *ADIPOQ* rs2241766 polymorphisms, according to the inheritance model, are shown in Table 2. No association was found between the response to treatment and any polymorphism.

In the logistic regression model, the genetic polymorphisms were included with other variables that showed the differences between the groups. We found that overweight/obesity and other prognostic markers still play an important role in the response to treatment. Other factors included the serum glucose levels and a progesterone receptor-positive status, but no association was found with any polymorphisms related to obesity (Table 3).

### Relation Between the *LEP*, *LEPR*, and *ADIPOQ* Polymorphisms and Their Association With Overweight/Obesity

The polymorphisms in *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101, and *ADIPOQ* rs2241766 had no association with the response to treatment, although several other studies have shown an association between obesity and a lack of response to treatment. It is possible that the relationship between genetic polymorphisms and response to treatment is indirect, so we conducted an analysis of the association between the genetic polymorphisms and overweight/obesity.

Polymorphism *LEP* rs7799039 (G/A) had an OR = 0.32 ( $P = .03$ ), *LEPR* rs1137101 (A/G) had an OR = 0.27 ( $P = .04$ ), and *ADIPOQ* rs2241766 (T/G) an OR = 2.69 ( $P = .05$ ), in the codominant model. With the dominant model, the OR = 0.32 ( $P = .03$ ) for *LEP* rs7799039, and the OR = 3.07 ( $P = .03$ ) for *ADIPOQ* rs2241766. With the additive model, the OR = 2.99 ( $P = .02$ ; Table 4). These results were consistent across inheritance patterns. In the case of *LEP* rs7799039 and *LEPR* rs1137101, the OR are risk protectors, and *ADIPOQ* rs2241766 is a risk-contributing factor to overweight/obesity.

### Analysis of Mediation From *LEP*, *LEPR*, and *ADIPOQ* Polymorphisms and Overweight/Obesity Upon Response to Treatment

To assess the association between the genetic polymorphisms and overweight/obesity with the response to therapy, a mediation analysis was performed (Table 5). We used obesity/overweight as the response variable, and a marginal negative association was observed with *LEP* rs7799039 ( $\beta = -0.64$ ;  $P = .06$ ) and a positive association with *ADIPOQ* rs2241766 ( $\beta = 1.25$ ;  $P = .02$ ). The mediation analysis of the response to treatment showed a positive association with p53, breast fibrosis, glucose levels, and clinical tumor stage. By integrating both variables into the model, the influence of overweight/obesity and the negative prognosis markers was observed. These results suggest a mediating effect from the polymorphisms *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101, and *ADIPOQ* rs2241766 on overweight/obesity, and in turn, this obesogenic condition affects the response to treatment (Figure 1).

### Serum *LEP* Levels in Patients

The serum *LEP* concentrations were measured in 59 patients. The mean *LEP* level was  $9.56 \pm 5.23$  ng/mL for the GG genotype,  $8.57 \pm 5.28$  ng/mL for the GA genotype, and  $7.60 \pm 4.20$  ng/mL for the AA



# LEP, LEPR, ADIPOQ Polymorphisms and Chemotherapy Response

**Table 1** Clinicopathological Characteristics of the Patients Analyzed in the Study

Description Parameter	Pathological Complete Response	No Response	P
Mean Age (SD), y	53.16 (±10.66)	52.75 (±13.99)	.56
Mean BMI	29.42 (±5.29)	30.76 (±7.66)	.13
Normal Weight	28 (18.3)	8 (33.3)	
Overweight	54 (35.3)	3 (12.5)	.03 <sup>a</sup>
Obesity	71 (46.4)	13 (54.2)	
<b>Risk Factors</b>			
Premenopausal	52 (34.0)	8 (33.3)	.90
Postmenopausal	101 (66.0)	16 (66.7)	
Oral contraceptive use			
Yes	65 (42.5)	7 (29.2)	.21
No	88 (57.5)	17 (70.8)	
Tobacco consumption			
Yes	33 (21.6)	2 (8.3)	.13
No	120 (78.4)	22 (91.7)	
Alcohol consumption			
Yes	16 (10.5)	4 (16.7)	.37
No	137 (89.5)	20 (83.3)	
<b>Comorbidities</b>			
Diabetes/hypertension			
Yes	43 (28.1)	5 (20.8)	.45
No	110 (71.9)	19 (79.2)	
BF/HIS			
Yes	24 (15.7)	10 (41.7)	.003 <sup>a</sup>
No	129 (84.3)	14 (58.3)	
<b>Tumor Characteristics</b>			
Histology			
Ductal	137 (89.5)	22 (91.7)	
Lobular	15 (8.9)	2 (8.3)	.89
Mixed	1 (0.7)	0	
Tumor stage			
I	10 (6.5)	1 (4.2)	.013 <sup>a</sup>
II	71 (46.4)	4 (16.7)	
III	72 (47.1)	19 (79.2)	
Metastasis			
Yes	7 (4.6)	16 (66.7)	.001 <sup>a</sup>
No	144 (95.4)	8 (33.3)	
Lymph node status (presence)			
Yes	103 (67.3)	18 (75.0)	.45
No	50 (32.7)	6 (25)	
ER			
Positive	75 (49.0)	10 (41.7)	.50
Negative	78 (51.0)	14 (58.3)	
PR			
Positive	68 (44.4)	11 (45.8)	.89
Negative	85 (55.6)	13 (54.2)	

**Table 1** Continued

Description Parameter	Pathological Complete Response	No Response	P
HER2			
Positive	34 (22.4)	4 (16.7)	.52
Negative	118 (77.6)	20 (83.3)	
Triple Negative			
Positive	20 (13.2)	2 (8.3)	.50
Negative	123 (86.8)	22 (91.7)	
<b>Prognostic Biomarkers</b>			
Ki-67			
Positive	33 (21.6)	8 (33.3)	.20
Negative	120 (78.4)	16 (66.7)	
E-cadherin			
Positive	24 (15.7)	8 (33.3)	.03 <sup>a</sup>
Negative	129 (84.4)	16 (66.7)	
p53			
Positive	27 (17.6)	8 (33.3)	.07
Negative	126 (82.4)	16 (66.7)	
<b>Glucose (&gt;106 mg/dL)</b>	42 (27.5)	12 (50.0)	.02 <sup>a</sup>

Data are presented as n (%) except where otherwise stated.

Abbreviations: BF/HIS = breast fibrosis/hysterectomy; BMI = body mass index; ER = estrogen receptor; PR = progesterone receptor.

<sup>a</sup>χ<sup>2</sup>test.

genotype of *LEP* rs7799039 ( $P = .54$ ). The mean *LEP* level for patients with the *LEPR* rs1137101 polymorphism was  $9.46 \pm 5.09$  ng/mL for GG,  $8.60 \pm 5.36$  ng/mL for GA, and  $7.60 \pm 4.20$  ng/mL for the AA genotype, and no significant difference was observed ( $P = .54$ ; Figure 2A and B). We noted a decrease in serum *LEP* concentration ( $3.87 \pm 1.28$ ;  $P < .05$ ) when *LEPR* rs1137101 was GG and *LEP* rs7799039 was the AA genotype (Figure 2C). Moreover, the *LEP* concentrations were higher in women who had estrogen receptor (ER)-positive tumors ( $10.16 \pm 5.90$ ) compared with those whose tumors were ER-negative ( $7.34 \pm 3.77$ ;  $P = .05$ ; Figure 3).

## Discussion

Recent studies have shown that obesity plays a very important role in cancer development and the response to treatment. It is a contributing factor toward a poor prognosis, along with better known factors such as age, postmenopausal status, clinical stage, and expression markers such as p53, Ki-67, and e-Cad. In this study, we observed that women with a high BMI were principally postmenopausal with clinical stage III tumors, although no difference was found in the distribution of molecular subtypes between the response groups. However, of the 38 patients who were positive for HER2 and the 22 patients who were positive for triple negative, 89.4% and 91.9% were overweight/obese, respectively, suggesting that the obesogenic microenvironment might promote tumor development. In a related study, Borgquist et al reported a high frequency of the HER2 and triple negative markers in obese

**Table 2** Association of *LEP*, *LEPR*, and *ADIPOQ* Polymorphisms With Treatment Response in Different Inheritance Models

Genotype	Pathological Complete Response, n (%)	No Response, n (%)	OR	95% CI	P
<b>Codominant Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
GG	52 (34.0)	9 (37.5)	Ref.		
GA	80 (52.3)	11 (45.8)	0.79	0.31-2.05	.65
AA	21 (13.7)	4 (16.7)	1.10	0.30-3.96	.88
<i>LEPR</i> rs1137101					
AA	33 (21.6)	4 (16.7)	Ref.		
AG	66 (43.1)	48 (50.0)	1.5	0.45-5.01	.51
GG	54 (35.3)	37 (33.3)	1.10	0.58-2.09	.76
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
GG	79 (51.63)	12 (50.00)	Ref.		
GT	64 (41.83)	9 (37.50)	1.97	0.47-8.22	.35
TT	10 (6.54)	3 (12.50)	0.92	0.37-2.33	.87
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
TT	99 (64.7)	17 (70.8)	Ref.		
TG	48 (31.4)	6 (25.0)	0.72	0.26-1.96	.53
GG	6 (3.9)	1 (4.2)	0.97	0.10-8.57	.97
<b>Dominant Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
GG	52 (34.0)	9 (37.5)	Ref.		
GA+AA	101 (66.1)	15 (62.5)	0.79	0.31-2.05	.63
<i>LEPR</i> rs1137101					
AA	128 (66.3)	71 (65.7)	Ref.		
AG+GG	65 (33.7)	37 (34.3)	0.90	0.55-1.46	.67
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
GG	79 (51.63)	12 (50.00)	Ref.		
GT+TT	74 (48.37)	12 (50.00)	1.10	0.45-2.52	.88
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
TT	99 (64.7)	17 (70.8)	Ref.		
TG+GG	54 (35.3)	7 (29.2)	0.75	0.29-1.93	.55
<b>Recessive Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
GG+GA	132 (86.3)	20 (83.3)	Ref.		
AA	21 (13.7)	4 (16.7)	1.38	0.40-4.79	.61
<i>LEPR</i> rs1137101					
AA+AG	128 (66.3)	71 (65.7)	Ref.		
GG	65 (33.7)	37 (34.3)	0.90	0.55-1.46	.67
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
GG+GT	143 (93.46)	21 (87.50)	Ref.		
TT	10 (6.54)	3 (12.50)	2.13	0.49-9.24	.13
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
TT+TG	147 (96.1)	23 (95.8)	Ref.		
GG	6 (3.9)	1 (4.2)	1.33	0.13-13.04	.80
<b>Additive Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
			0.98	0.51-1.88	.96
<i>LEPR</i> rs1137101					
			1.05	0.58-1.90	.85
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
			1.20	0.61-2.35	.58
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
			0.82	0.36-1.83	.63

Abbreviation: Ref. = referent.

**Table 3** Association Factors With Response to Chemotherapy

Variable	OR	SE	z	P > z	95% CI
LEP rs7799039	0.60	0.26	-1.14	0.25	0.25-1.44
LEPR rs1137101	0.93	0.38	-0.17	0.84	0.41-2.08
ADIPOQ rs1501299	0.92	0.41	-0.17	0.85	0.38-2.20
ADIPOQ rs2241766	1.14	0.62	0.24	0.82	0.38-3.36
Overweight/Obesity	0.15	0.11	-2.43	0.015 <sup>a</sup>	0.03-0.69
Tobacco Consumption	0.13	0.12	-2.14	0.032 <sup>a</sup>	0.02-0.84
Alcohol Consumption	4.31	3.74	1.68	0.093	0.78-23.65
p53	5.39	4.57	1.99	0.047 <sup>a</sup>	1.02-28.40
BF/HIS	4.80	3.10	2.43	0.015 <sup>a</sup>	1.35-17.03
Glucose >106 mg/dL	4.35	2.69	2.37	0.018 <sup>a</sup>	1.29-14.66
PR <sup>+</sup>	4.26	3.21	1.92	0.054	0.97-18.70
Stage	7.09	4.78	2.91	0.004 <sup>a</sup>	1.89-26.58

Abbreviations: BF/HIS = breast fibrosis/hysterectomy; PR = progesterone receptor; SE = standard error.  
<sup>a</sup>Significant P-value.

women.<sup>19</sup> However, the relationship between BMI and various tumor characteristics has not yet been fully explored, and a better understanding could help elucidate the mechanisms involved in the progression of cancer and the influence of overweight/obesity on the response to treatment.

It has been reported that obese women who are diagnosed with cancer have other comorbidities that complicate their treatment, typically metabolic syndrome. In this regard, Ray et al suggested that obesity promotes a tumorigenic microenvironment by increasing the secretion of LEP, inflammatory cytokines, and growth factors.<sup>20</sup> This highlights the importance of the routine, complete laboratory analysis of cholesterol, triglycerides, glucose, and C-reactive protein, which are inexpensive biomarkers that can be screened in most hospitals. This would determine the presence of metabolic syndrome, which might interfere with treatment. In our study, we analyzed the levels of serum glucose, which were very high in the group of nonresponders, although no significant differences between diabetes and hypertension comorbidities were observed in either response group. However, there is the possibility that these comorbidities were not detected before the cancer diagnosis. In addition, it is known that tumors are glucose-dependent and can change their metabolic programming to increase the energy levels to meet the growth demands of the tumor. There is evidence of the involvement of different factors associated with overweight/obesity and a possible relationship with the progression of breast cancer. Mortality and survival studies that have linked cancer and obesity show that adiposity is associated with a poor prognosis and increased rates of disease recurrence because adipose tissue is a source of energy and estrogens.<sup>21</sup>

Furthermore, it has been proposed that the presence of polymorphisms in adipose-associated genes such as *LEPR*, *LEP*, and *ADIPOQ* are linked to an increased risk of overweight/obesity and other metabolic disturbances and are probably associated with a lack of response to treatment and a progression of breast cancer.<sup>22,23</sup> In our study, we found an indirect association between these polymorphisms and treatment response, however, elevated glucose levels (OR, 4.35; 95% CI, 1.29-14.66), ER-positive status (OR, 4.26; 95% CI, 0.97-18.70), and clinical stage (OR, 7.09; 95% CI, 1.89-26.58),

which have also been linked to overweight/obesity, had a significant association. Therefore, we conducted an analysis of the association between *LEPR* rs1137101, *LEP* polymorphism rs7799039, *ADIPOQ* rs2241766 and rs1501299, and overweight/obesity, where we found a consistent association, even between models of inheritance, and the relevance of the ORs was maintained. We then suggested the possibility of an indirect effect, and there might be a mediating effect of polymorphisms that favor the development of overweight/obesity. When cancer is established, an obesogenic environment promotes further tumor growth and resistance to treatment. There is evidence that LEP as well as its receptor communicate with other signaling pathways that might be involved in resistance to therapy. Examples include cytokines, growth factors, angiogenesis factors, and steroid hormones, including estrogens, progesterone, glucocorticoids, and insulin pathways.<sup>8,24,25</sup>

In vitro studies have shown that LEP is secreted by adipose tissue and is closely related to elevated levels of estrogen. Catalano et al reported that LEP can transactivate the ER and increase aromatase expression in MCF7 cells, which promotes carcinogenic development.<sup>26</sup> In our study, the serum LEP concentrations were found in the range of 3.87 ng/mL to 17.22 ng/mL, when analyzing the polymorphisms in *LEP* and *LEPR*. In this regard, Chavarria-Avila et al reported serum LEP values of  $17.6 \pm 14.62$  ng/mL in subjects of normal weight and  $58.2 \pm 31.35$  ng/mL in obese subjects, indicating that the serum LEP concentration increases with the level of adiposity.<sup>27</sup> Regarding the polymorphism *LEP* rs7799039, our data are consistent with those reported by the authors; the genotype G/G results in higher serum levels of LEP compared with the heterozygous G/A and homozygous A/A genotypes, suggesting that LEP concentration is influenced by polymorphisms in the gene, as has been reported. In addition, the serum LEP concentration was higher in patients with ER-positive tumors. Although estrogens are important regulators of carcinogenic development, ER-positive patients respond well to an antihormone therapy that is administered in combination with chemotherapy.

These results support the findings that the effect of polymorphisms on resistance to chemotherapy is indirect and mediated by an obese condition in which polymorphisms are a risk factor for

**Table 4** Association of *LEP*, *LEPR*, and *ADIPOQ* Polymorphisms and Overweight/Obesity in Inheritance Models

Genotype	Pathological Complete Response, n (%)	No Response, n (%)	OR	95% CI	P
<b>Codominant Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
GG	5 (16.7)	56 (38.1)	Ref.		
GA	20 (66.7)	71 (48.3)	0.32	0.11-0.90	.03 <sup>a</sup>
AA	5 (16.6)	20 (13.6)	0.36	0.09-1.36	.10
<i>LEPR</i> rs1137101					
AA	3 (10.0)	34 (23.1)	Ref.		
AG	19 (63.3)	59 (40.1)	0.27	0.07-0.99	.04 <sup>a</sup>
GG	8 (26.7)	54 (36.8)	0.59	0.14-2.40	.46
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
GG	14 (46.7)	77 (52.4)	Ref.		
GT	14 (46.7)	59 (40.1)	0.77	0.43-1.57	.35
TT	2 (6.6)	11 (7.5)	1.00	0.19-5.00	1.00
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
TT	25 (88.3)	91 (61.9)	Ref.		
TG	5 (16.7)	49 (33.3)	2.69	0.97-7.47	.05 <sup>a</sup>
GG	0 (0.0)	7 (4.8)	—	—	—
<b>Dominant Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
GG	5 (16.7)	56 (38.1)	Ref.		
GA and AA	25 (83.3)	91 (61.9)	0.32	0.11-0.89	.03 <sup>a</sup>
<i>LEPR</i> rs1137101					
AA	3 (10.0)	34 (23.1)	Ref.		
AG and GG	27 (90.0)	113 (76.9)	0.36	0.10-1.29	.11
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
GG	14 (46.7)	77 (52.4)	Ref.		
GT and TT	16 (53.3)	70 (47.6)	0.79	0.36-1.74	.56
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
TT	25 (83.3)	91 (61.9)	Ref.		
TG and GG	5 (16.7)	56 (38.1)	3.07	1.11-8.5	.03 <sup>a</sup>
<b>Recessive Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
GG and GA	25 (83.3)	127 (86.4)	Ref.		
AA	5 (16.7)	20 (13.6)	1.12	0.37-3.37	.83
<i>LEPR</i> rs1137101					
AA and AG	22 (73.3)	93 (63.3)	Ref.		
GG	8 (26.7)	54 (36.7)	2.17	0.87-5.37	.09
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
GG and GT	28 (93.3)	136 (92.5)	Ref.		
TT	2 (6.7)	11 (7.5)	1.30	0.25-6.56	.74
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
TT and TG	30 (100)	140 (95.2)	Ref.		
GG	5 (0.0)	7 (4.8)	—	—	—
<b>Additive Model</b>					
<i>LEP</i> rs7799039					
			0.57	0.32-1.04	.07
<i>LEPR</i> rs1137101					
			0.94	0.55-1.61	.83
<i>ADIPOQ</i> rs1501299					
			0.88	0.47-1.63	.68
<i>ADIPOQ</i> rs2241766					
			2.99	1.14-7.86	.02 <sup>a</sup>

Abbreviation: Ref. = referent.

<sup>a</sup>Significant *P*-value.

# LEP, LEPR, ADIPOQ Polymorphisms and Chemotherapy Response

**Table 5** Analysis of Mediation: Overweight/Obesity and Response to Treatment

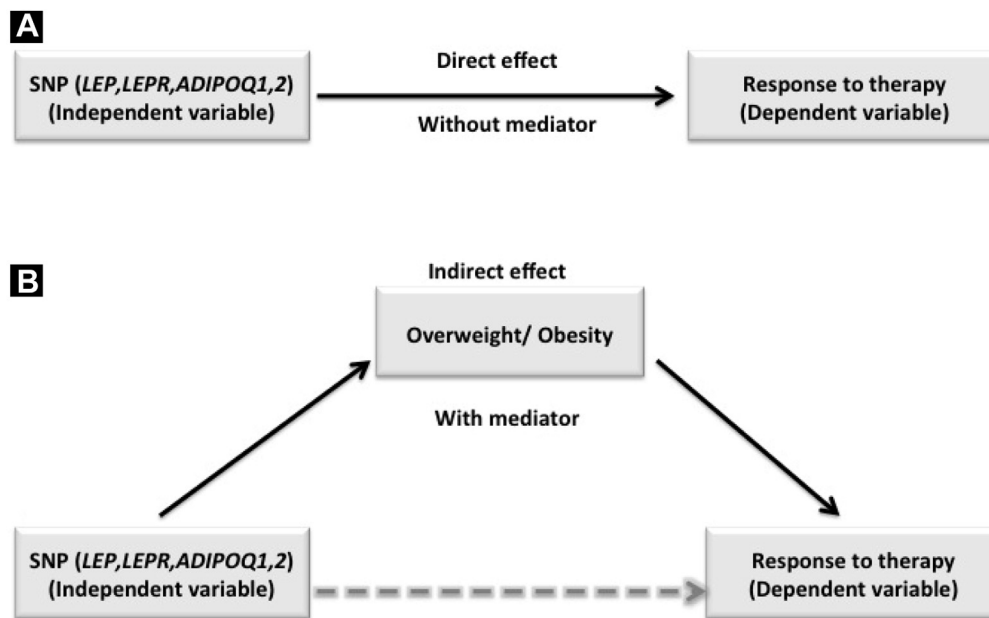
	Coefficient	SE	z	P > z	95% CI
<b>Overweight/Obesity Mediation Test</b>					
LEP rs7799039	-0.59	0.33	-1.78	0.07	-1.24 to 0.05
LEPR rs1137101	-0.01	0.29	-0.04	0.96	-0.59 to 0.57
ADIPOQ rs1501299	-0.28	0.35	-0.81	0.41	-0.98 to 0.40
ADIPOQ rs2241766	1.31	0.56	2.35	0.01 <sup>a</sup>	0.21-2.41
Tobacco consumption	-0.68	0.50	-1.37	0.17	-1.66 to 0.28
Alcohol consumption	-0.09	0.70	-0.13	0.89	-1.47 to 1.28
p53	-0.76	0.66	-1.18	0.24	-2.04 to 0.51
BF/HIS	-1.35	0.49	-2.77	0.006 <sup>a</sup>	-2.30 to -0.39
Glucose >106 mg/dL	0.99	0.57	1.74	0.08	-0.12 to 2.11
PR <sup>+</sup>	-0.76	0.70	-1.08	0.27	-2.13 to 0.61
Stage	0.15	0.47	0.33	0.74	-0.76 to 1.07
<b>No Response Test Mediation Test</b>					
LEP rs7799039	-0.24	0.40	0.61	0.54	-1.02 to 0.54
LEPR rs1137101	-0.004	0.37	-0.01	0.99	-0.74 to 0.73
ADIPOQ rs1501299	-0.01	0.40	-0.03	0.97	-0.79 to 0.77
ADIPOQ rs2241766	-0.13	0.49	-0.28	0.77	-1.10 to 0.88
Tobacco consumption	-1.52	0.85	-1.78	0.07	-3.20 to 0.15
Alcohol consumption	1.36	0.81	1.68	0.09	-0.22 to 2.95
p53	1.55	0.75	2.06	0.04 <sup>a</sup>	0.07-3.04
BF/HIS	1.85	0.60	3.08	0.002 <sup>a</sup>	0.67-3.03
Glucose >106 mg/dL	1.15	0.54	2.14	0.03 <sup>a</sup>	0.09-2.21
PR <sup>+</sup>	1.27	0.71	1.79	0.07	-0.12 to 2.68
Stage	1.76	0.62	2.81	0.005 <sup>a</sup>	0.53-2.99
<b>Overweight/Obesity-No Response Mediation Test</b>					
Overweight/obesity	-1.80	0.74	-2.44	0.01 <sup>a</sup>	-3.26 to -0.35
LEP rs7799039	-0.47	0.43	-1.09	0.27	-1.33 to 0.37
LEPR rs1137101	-0.009	0.39	-0.02	0.98	-0.79 to 0.77
ADIPOQ rs1501299	-0.08	0.41	-0.21	0.83	-0.90 to 0.72
ADIPOQ rs2241766	0.11	0.51	0.22	0.82	-0.88 to 1.11
Tobacco consumption	-1.92	0.89	-2.14	0.03 <sup>a</sup>	-3.68 to -0.16
Alcohol consumption	1.39	0.83	1.67	0.09	-0.24 to 3.02
p53	1.65	0.81	2.04	0.04 <sup>a</sup>	0.06-3.24
BF/HIS	1.57	0.63	2.47	0.01 <sup>a</sup>	0.32-2.81
Glucose >106 mg/dL	1.47	0.59	2.48	0.01 <sup>a</sup>	0.31-2.64
PR <sup>+</sup>	1.45	0.72	1.99	0.05 <sup>a</sup>	0.02-2.88
Stage	1.95	0.65	2.98	0.003 <sup>a</sup>	0.66-3.24

Abbreviations: BF/HIS = breast fibrosis/hysterectomy; PR = progesterone receptor; SE = standard error.  
<sup>a</sup>Significant P-value.

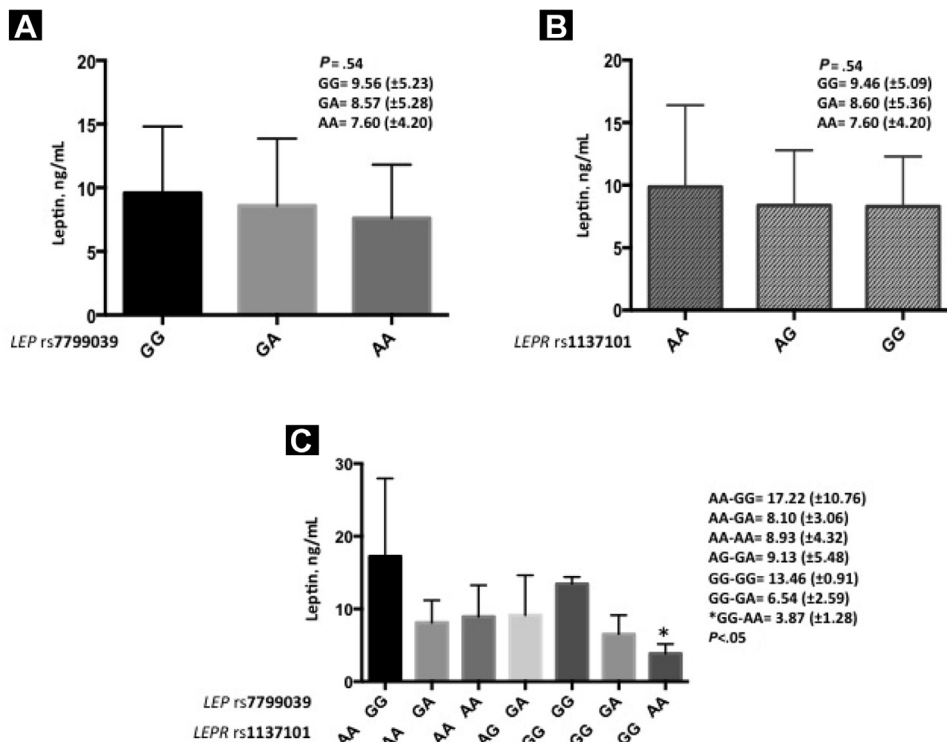
obesity and that alterations characteristic of obesity affect the response to treatment. However, among the strengths of our study is the homogeneity of the sample, that all patients had primary breast cancer, only stage I to stage III (because stage IV has implicit poor prognosis); we analyzed the intrinsic factors (genes associated with obesity), extrinsic factors (lifestyle parameters), and some important biomarkers for obesity and cancer. However, among the weaknesses of our study is the categorization of the response to treatment only in pCR or NR and the lack of strict follow-up with the patients; this because of several reasons. There are clinical-

pathological parameters that are not routinely evaluated because of lack of resources in public health institutions and the high number of patients that are received, mainly in stage IV. In the case of follow-up, several patients do not attend their appointments after neoadjuvant treatment and surgery, in many cases because of economic issues. Therefore, the implementation of a system that stratifies patients with residual disease, as was reported by Symmans et al,<sup>28</sup> in which stratification of the residual disease as a continuous variable that can be used to identify subgroups for which is possible to make a more precise prognosis; this will allow better decisions to

**Figure 1** (A) Common Model of Effects of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Response to Treatment. (B) Hypothetical Model of the Mediating Effect of SNPs on Overweight/Obesity and the Association With a Changing Response to Treatment

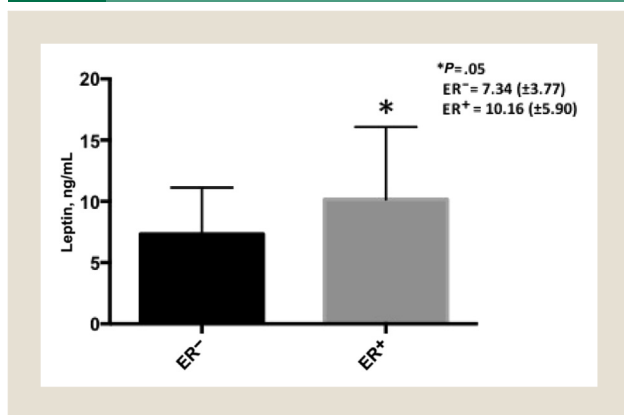


**Figure 2** Comparison of Mean Leptin Levels and SNPs: (A) Leptin Mean (ng/mL) and *LEP* rs7799039 Genotype (Kruskal–Wallis Test; No Significant Differences); (B) Leptin Mean (ng/mL) and *LEPR* rs1137101 Genotype (Kruskal–Wallis Test; No Significant Differences); (C) Leptin Mean (ng/mL) and Wild Type of *LEP* rs7799039/*LEPR* rs1137101 Versus Polymorphic Genotypes (Kruskal–Wallis Test; \* $P < .05$  AA-GG vs. GG-AA Genotypes)





**Figure 3** Comparison of Mean Leptin Levels and the Expression of Estrogen Receptor (ER)-Negative Versus ER<sup>+</sup> (Mann–Whitney Test; \**P* < .05)



be made about adjuvant treatment, according to the subgroup, and this will have beneficial repercussions on the survival and quality of life of patients.

## Conclusion

In our study we found that there is a direct association between the *LEP* rs7799039 and *ADIPOQ* rs1501299 polymorphisms and overweight/obesity and that these conditions affect the response to chemotherapy treatment. The obesogenic environment plays an important role in defining the tumor microenvironment by promoting tumor progression and resistance to therapy, as reported in in vitro studies.

## Clinical Practice Points

- Recent studies have shown that obesity plays a very important role in cancer development.
- Has been reported that obese women who are diagnosed with cancer have other comorbidities that complicate their treatment, typically metabolic syndrome.
- In this study, we observed that women with a high BMI were principally postmenopausal with clinical stage III tumors.
- Furthermore, it has been proposed that the presence of polymorphisms in adipose-associated genes such as *LEPR*, *LEP*, and *ADIPOQ* are linked to an increased risk of overweight/obesity and other metabolic disturbances and are probably associated with a lack of response to treatment and a progression of breast cancer.
- In our study, we found an indirect association between these polymorphisms and treatment response in Mexican women with breast cancer.
- It is important to take into account the state of obesity and metabolic alterations in the integration of treatment.

## Acknowledgments

This study was supported by a scholarship CVU 207634, number 335033 (A.M.-H.). We thank the program Doctorado en Ciencias Biomédicas of the Universidad Juárez del Estado de Durango for the financial support provided for this research.

## Disclosure

The authors have stated that they have no conflicts of interest.

## References

1. De Santis C, Siegel R, Bandi P, Jemal A. Breast cancer statistics, 2011. *CA Cancer Clin* 2011; 61:408-18.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. GLOBOCAN 2012 v1. 0. 2013. Available at: <http://globocan.iarc.fr>.
3. Yardley DA, Peacock NW, Dickson NR, et al. A phase II trial of neoadjuvant gemcitabine, epirubicin, and docetaxel as primary treatment of patients with locally advanced or inflammatory breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2010; 10: 217-23.
4. Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45: 228-47.
5. Park J, Morley TS, Kim M, Clegg DJ, Scherer PE. Obesity and cancer mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:455-65.
6. James FR, Wootton S, Jackson A, Wiseman M, Copson ER, Cutress RI. Obesity in breast cancer—what is the risk factor? *Eur J Cancer* 2015; 51:705-20.
7. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:911-9.
8. Han CZ, Du LL, Jing JX, et al. Associations among lipids, leptin, and leptin receptor gene Gln223Arg polymorphisms and breast cancer in China. *Biol Trace Elem Res* 2008; 126:38-48.
9. He G, Dhar D, Nakagawa H, et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013; 155:384-96.
10. Teras LR, Goodman M, Patel AV, et al. No association between polymorphisms in *LEP*, *LEPR*, *ADIPOQ*, *ADIPOR1*, or *ADIPOR2* and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:2553-7.
11. Liu CL, Chang YC, Cheng SP, et al. The roles of serum leptin concentration and polymorphism in leptin receptor gene at codon 109 in breast cancer. *Oncology* 2007; 72:75-81.
12. Cleveland RJ, Gammon MD, Long CM, et al. Common genetic variations in the *LEP* and *LEPR* genes, obesity and breast cancer incidence and survival. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120:745-52.
13. Mohammadzadeh G, Ghaffari MA, Bafandeh A, Hosseini MM. Effect of leptin receptor Q223R polymorphism on breast cancer risk. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17:588-94.
14. Grossmann ME, Cleary MP. The balance between leptin and adiponectin in the control of carcinogenesis—focus on mammary tumorigenesis. *Biochimie* 2012; 94: 2164-71.
15. Khan S, Shukla S, Sinha S, Meeran SM. Role of adipokines and cytokines in obesity-associated breast cancer: therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013; 24:503-13.
16. Yang Y, Zhang F, Ding R, et al. *ADIPOQ* gene polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis. *Cytokine* 2013; 61:565-71.
17. Kaklamani VG, Hoffmann TJ, Thornton TA, et al. Adiponectin pathway polymorphisms and risk of breast cancer in African Americans and Hispanics in the Women's Health Initiative. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139:461-8.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
19. Borgquist S, Jirstrom K, Anagnostaki L, Manjer J, Landberg G. Anthropometric factors in relation to different tumor biological subgroups of postmenopausal breast cancer. *Int J Cancer* 2009; 124:402-11.
20. Ray A, Cleary MP. Obesity and breast cancer: a clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 2012; 45:189-97.
21. Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:279-92.
22. Ghalandari H, Hosseini-Esfahani F, Mirmiran P. The association of polymorphisms in leptin/leptin receptor genes and ghrelin/ghrelin receptor genes with overweight/obesity and the related metabolic disturbances: a review. *Int J Endocrinol Metab* 2015; 13:e19073.
23. Parekh N, Chandran U, Bandera EV. Obesity in cancer survival. *Annu Rev Nutr* 2012; 32:311-42.
24. Yom CK, Lee KM, Han W, et al. Leptin as a potential target for estrogen receptor-positive breast cancer. *J Breast Cancer* 2013; 16:138-45.
25. Newman G, Gonzalez-Perez RR. Leptin—cytokine crosstalk in breast cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382:570-82.
26. Catalano S, Mauro L, Marsico S, et al. Leptin induces, via ERK1/ERK2 signal, functional activation of estrogen receptor  $\alpha$  in MCF-7 cells. *J Biol Chem* 2004; 279:19908-15.
27. Chavarria-Avila E, Vázquez-Del Mercado M, Gomez-Bañuelos E, et al. The impact of *LEP* G-2548A and *LEPR* Gln223Arg polymorphisms on adiposity, leptin, and leptin-receptor serum levels in a Mexican Mestizo population. *Biomed Res Int* 2015; 2015:539408.
28. Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol* 2015; 25: 4414-22.





## Polymorphisms *FTO* rs9939609, *PPARG* rs1801282 and *ADIPOQ* rs4632532 and rs182052 but not lifestyle are associated with obesity related-traits 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-traits, 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-traits, while *PPARG* 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,  $p = 0.04$ ) (Ghousaini *et al.*, 2005).

*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 proopiomelanocortin-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  $\text{kg}/\text{m}^2$ . 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $3.5 \text{ mL O}_2\text{kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ). 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 (Internation-

**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)
<b>Familial history</b>	<b>n (%)</b>	
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>						
<b>rs4632532</b>						
	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>
<b>rs182052</b>						
	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
	$\beta$ (CI 95%, P-value)	$\beta$ (CI 95%, P-value)	$\beta$ (CI 95%, P-value)	$\beta$ (CI 95%, P-value)
BMI	<b>0.46</b> <b>(0.005-0.08, 0.03)</b>	-0.004 (-0.05-0.04, 0.87)	0.005 (-0.03- 0.04, 0.75)	-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	<i>FTO</i> rs9939609	<i>PPARG</i> rs1801282	<i>ADIPOQ</i> rs4632532	<i>ADIPOQ</i> rs182052
Parameter	$\beta$ (CI 95%, P-value)	$\beta$ (CI 95%, P-value)	$\beta$ (CI 95%, P-value)	$\beta$ (CI 95%, P-value)
Glucose	0.01 (-0.01 – 0.03, 0.36)	-0.02 (-0.05 – 0.006, 0.11)	0.003 (-0.02 – 0.02, 0.75)	0.001 (-0.02 – 0.02, 0.95)
Cholesterol	<b>0.06</b> <b>(0.01 – 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* rs9930609 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 Pùb 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.
- Ghousaini 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 Perez 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 Pùb 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 Pùbl 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-Sanchez 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 Villarreal-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, Szkudlarek-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



## Special Article - Childhood Obesity

# Monogenic, Polygenic and Multifactorial Obesity in Children: Genetic and Environmental Factors

Muñoz Yáñez C<sup>1\*</sup>, García Vargas GG<sup>1</sup> and Pérez-Morales R<sup>2\*</sup>

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

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, México

\*Corresponding author: Pérez-Morales R, 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, México

Muñoz Yáñez C, Departamento de Investigación. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez del Estado de Durango, Calz. Palmas 1 y Sixto Ugalde s/n. Col. Revolución. C.P. 35050 Gómez Palacio, Durango, México

Received: July 24, 2017; Accepted: September 12, 2017; Published: October 18, 2017

## Abstract

Obesity is a chronic disease that has increased alarmingly in recent years. It is considered a risk factor for the development of diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, dyslipidemia, and some types of cancer. Two genetic profiles have been described: monogenic obesity, in which a single gene is mutated, usually leading to loss-of-function or haploinsufficiency, and polygenic obesity, which involves several polymorphic genes with complex interactions between genes and environmental factors. In the latter case, the frequency of polymorphisms can be very high, depending on the population analyzed. In both cases, the genes of interest are associated with changes in body composition through different mechanisms, including hyperphagia, energy expenditure, adipocyte differentiation and lipolysis. However, most studies have analyzed genes associated with obesity in other populations, and the results are often inconsistent, so it is important to study the context of obesity, such as genetics, biochemical biomarkers and environmental factors. Environmental factors include physical activity, nutritional status, and an intake of foods rich in fats and carbohydrates that favor obesity in children. In addition, several chemical compounds have been described as potential endocrine disruptors that increase BMI and produce obesity, and some biological agents can alter the homeostasis of adipose tissue. In this review, we analyzed the genetic and environmental factors that influence obesity, particularly in children.

**Keywords:** Obesity; Overweight; Mutation; Polymorphisms; Environment; Children; Biomarkers

## Abbreviations

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development; BMI: Body Mass Index; LEP: Leptin; LEPR: Leptin Receptor; POMC: Proopiomelanocortin; PCSK1: Prohormone convertase 1/3; MC4R: Melanocortin 4 Receptor; SIM1: Single Minded Homologue 1; GWAS: Genome Wide Association Studies; PPAR $\gamma$ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ ; ADIPOQ: Adiponectin; FTO: Fat-Mass and Obesity Associated Gene; SNP: Single Nucleotide Polymorphism; CED: Chemical Endocrine Disruptors; DDE: Diphenyl-dichloro-Ethylene (DDE); BPA: Bisphenol A

## Introduction

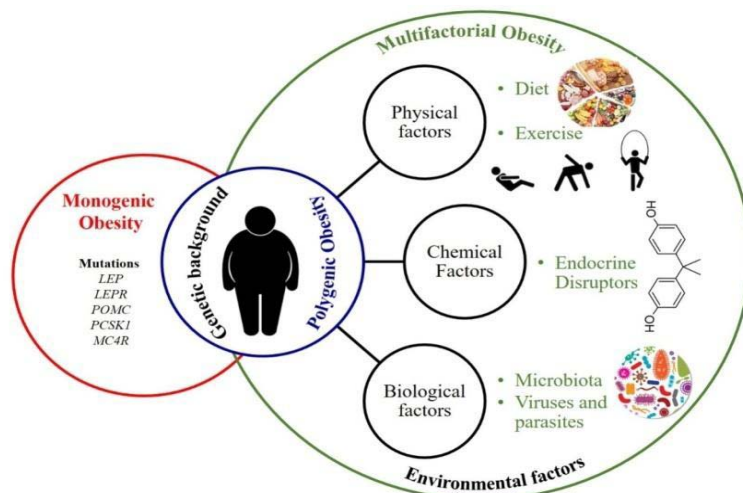
Obesity is a chronic disease of diverse etiology. In the genetic context, monogenic obesity is associated with loss-of-function mutations in a single gene. These mutations are very rare and are in some cases unique to a patient or several members of a family; in some populations with high rates of consanguinity, the mutations are more frequent [1]. In polygenic obesity, there is an interaction between several polymorphic genes; in this case, the frequency is greater than 1% and varies by the population analyzed. In this type of obesity, the risk that is attributed to each allele is generally small, but the additive effect of several risk alleles can considerably increase susceptibility to obesity [2]. Multifactorial obesity refers the involvement of other environmental factors, or the obesogenic environment. These factors include: a) physical agents, such as the specific diet of each population,

the nutritional status of individuals, and physical activity; b) chemical agents, such as pesticides and other compounds that function as endocrine disruptors and modify signaling pathways, particularly alterations in the leptin/adiponectin pathway, insulin/glucose, fatty acid metabolism, and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis; and c) biological agents, such as viruses that may have obesogenic potential and microbiota involved in metabolism and bioavailability of various nutritional components [3,4]. Figure 1 shows the relationship between all factors leading to obesity.

## Epidemiology of Obesity in Children

Obesity is a risk factor for the development of chronic non-communicable diseases, such as type 2 diabetes, hypertension, dyslipidemia, cardiovascular diseases, and some types of cancer [5]. It has become a very costly public health problem, and in 2009, it was estimated that the cost in different countries worldwide ranged from 0.7% to 2.8% of national health expenditure [6]. In 2014, the global economic impact of obesity was estimated in the US to be \$2.0 trillion or 2.8% of its national health expenditure. Another important consideration is profit losses due to low productivity, disability, or even permanent disability [7].

A report by the Commission on Ending Childhood Obesity (2016) shows that at least 41 million children under age five are overweight or obese, and most of them live in developing or underdeveloped countries [8]. The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) reports that one in six children (under 15 years



**Figure 1:** Factors associated and related with obesity in children. In monogenic obesity, a mutation in a single gene is sufficient to develop the disease, children are the most affected. In polygenic obesity, several candidate genes have been associated with obesity; however, studies are inconsistent across populations due to gene - environment interactions. In addition, exist evidence that diet, physical activity, the presence of chemical compounds such as endocrine disruptors and the specific microbiota of everyone may be risk factors for obesity.

old) is overweight or obese. According to OECD projections, by 2030, the prevalence of obesity will increase in the United States, Mexico, and England to 47%, 39%, and 35%, respectively [9]. In a review of studies of the global burden of disease, they evaluated the prevalence of overweight and obesity worldwide between 1980 and 2013 in 1769 studies. They found that the number of overweight or obese people increased from 857 million in 1980 to 2.1 billion in 2013. In the case of children, the prevalence of overweight and obesity increased from 16.55% in 1980 to 23.2% in 2013 in developed countries and followed a similar pattern in developing countries where it increased from 8.25% to 13.15% [10].

## Intrinsic Factors Involved in Obesity: Genetic Backgrounds

The terms mutation and polymorphism refer to changes in the DNA sequence; these may be a point change, deletion, or insertion. Although both terms refer to the same event, the mutation is usually associated with the disease and has a very low frequency. Mutations are mapped in familial studies of genetic linkage and therefore may differ between families and have extremely low frequencies; in the literature, they are defined as rare mutations. On the other hand, a polymorphism is a change in the DNA sequence that is associated with natural genetic variability and is highly represented in human populations; at least 1% are carriers. Polymorphisms do not necessarily lead to disease, though they increase susceptibility if associated with other genetic (polygenic model) or environmental factors (multifactorial model). High heritability of obesity has been observed in both monogenic and polygenic-multifactorial contexts, and the most frequent associations in children are described below.

### Genes involved in monogenic childhood obesity

Obesity associated with monogenic factors refers to the presence of mutations in a single gene. They are often autosomal loss-of-function mutations that have a dominant or codominant effect, resulting in haploinsufficiency. A mutated copy of the gene is sufficient

to develop the phenotype, heterozygous individuals are obese, and in homozygous individuals this condition is more severe. This type of mutation has been reported in children with morbid obesity who generally present with high BMI, compulsive hyperphagia, endocrine abnormalities and in some cases developmental delays. Among the most important genes in this category are *LEP* (Leptin), *LEPR* (Leptin Receptor), *POMC* (Proopiomelanocortin), *PCSK1* (Prohormone convertase 1/3), *MC4R* (Melanocortin 4 receptor) and *SIM1* (Single minded homologue 1).

### Leptin (*LEP*)

Leptin is a 16-kD protein that consists of 167 amino acids and is mainly secreted from white adipose tissue. This protein acts on the hypothalamic regions of the brain, which control eating behavior, and plays a critical role in the regulation of body weight by inhibiting food intake and stimulating energy expenditure [11]. In addition, leptin has a variety of other functions, including the regulation of hematopoiesis, angiogenesis, wound healing, and the immune and inflammatory response; therefore, it is a hormone with pleiotropic effects [12]. Defects in leptin production cause early and severe hereditary obesity, an absence of circulating leptin, and hyperphagia. Several mutations have been described in different populations, most frequent in families with high consanguinity rates. A consistent change is the mutation N103K; children with this mutation have very low serum leptin levels, suggestive of a functional impact [13-16]. In studies of leptin deficiency, leptin replacement therapy has had a positive impact by preventing weight gain and obesity; treatment with recombinant human leptin (metreleptin) rapidly normalized eating behavior and resulted in weight loss [17].

### Leptin receptor (*LEPR*)

Leptin receptor belongs to the glycoprotein 130 (gp130) family of cytokine receptors and has six known isoforms (*LEPR a - f*); *LEPR-b* is the longest. Leptin receptor is found in many tissues in several alternatively spliced forms, raising the possibility that leptin exerts effects on many tissues, including the hypothalamus. Leptin acts

**Table 1:** Genetic factors associated with monogenic obesity in children.

Gene/Function	Mutations	Biological effect or characteristics	Design of the studies	Reference
<b>LEP/Leptin</b> Hormone involved in the regulation of food intake and energy expenditure.	p.L72S, p.N103K, p.R105W, p.H118L, p.S141C, p.W121X c.104_106delTCA, c.135del3bp, c.398delG, c.481_482delCT, c.163C>T.	Deficiency or inefficiency.	Review	[20]
	p.N103K	Change of amino acid. Deficiency in energy regulation pathway.	Screening 457 subjects of Pakistan, 1 child was carrier.	[22]
	1-44del42, c.350G>A (p.C117Y), c.313C>T (p.R105W), c.398delG (p.G133_VfsX14).	42 bp deletion intron 1, missense mutation, truncated protein, missense mutation. Severe obesity.	Cohort of 73 Pakistani children from consanguineous families	[23]
	W121X	Novel homozygous nonsense mutation, leptin deficiency. Severe obesity.	Case report/Egypt	[24]
	c.144del TAC (G1n49Thrfs*23)	Novel homozygous frameshift mutation. Excessive weight gain and hyperphagia.	Case report/ Saudi parents with known consanguinity	[25]
	c.298G>Tp.D100Y	Novel homozygous transversion, leading to a change from aspartic acid to tyrosine at amino acid and high immunoreactive levels of leptin. Severe obesity	Case report/Turkish parents	[26]
<b>LEPR/Leptin receptor</b> The binding of leptin to its receptor triggers hormone-mediated signaling.	1.3 - 58.8 kb del, c.1810T>A (p.C604S), c.2396-1G>T, c.1675G>A (p.W558*)	Homozygous deletion, missense mutation, splice site, nonsense mutation. Severe obesity	Cohort of 73 Pakistani children from consanguineous families	[23]
	Chromosome 1 isodisomy	Frameshift exon 14. Severe obesity with hyperphagia and delayed puberty.	Case report/France	[27]
<b>POMC/Promelanocortin</b> Precursor protein of several active peptides of the melanocortin system.	Heterozygosity for c.-11C>A/p.W84X mutations	Frameshift mutation, truncated preprohormone. Growth acceleration, moderate obesity and recurrent cholestasis.	Case report/Russia	[31]
	Heterozygosity for R236G	Abnormal processing. Obese subject	Cross-sectional/Pakistan	[32]
	Homozygous mutation c.64delA	Deletion, no protein. Rapid weight gain, obesity, and episodes of hypoglycemia	Case report/Turkey	[33]
	Homozygous 5' untranslated region mutation 11C>A.	Abolish normal synthesis. Severe obesity, adrenocorticotrophic hormone deficiency.	Cases report/USA	[34]
	Homozygous single substitution C202T (p.Gln68X).	Stop codon, no protein. Severe obesity and hypoglycaemia.	Case report/Italy Non-consanguineous family of Egyptian ancestry	[35]
	p.Arg86Term	Stop codon, no protein. Hypocortisolism, hyperphagia, early-onset obesity, skin pigmentation.	Case report/India	[36]
	662A>G (Tyr221Cys), 394C>G (Pro132Ala), 511G>T (Ala171Ser), 706C>G (Arg236Gly).	Change amino acid. BMI increased and family history of obesity.	Screening Case-control/ Norway	[37]
<b>PCK1/Prohormone convertase</b> Endoprotease that process large precursor proteins into mature bioactive products.	909C>A (Phe303Leu), 989C>T (Ser330Phe), 1405G>A (Val469Ile), 1096-10C>T Splice, 397-10T>C Splice	Change amino acid and spliced variants. BMI increased and family history of obesity.	Screening Case-control/ Norway	[37]
	Novel heterozygous variants (c.1095 p 1G > A and p.S24C)	Loss enzymatic activity. Extreme obesity, impaired glucose tolerance.	Study on 52 obese children of Obesity Childhood cohort / Germany	[38]
	Missense: c.625G>A (p.G209R), c.772C>A (p.P258T), c.1269C>A (p.N423K), c.1643T>C (p.F548S), c.1777G>A (p.G593R). Nonsense: c.2T>C (p.M1X), c.693C>G (p.Y231X), c.1009C>T (p.Q337X), c.1213C>T (p.R405X). Deletion: c.1349_1352delTGGA (p.V450fsX1) Splice site: c.1095+1T (IVS8p1G>T) c.1095+1A (IVS8p1G>A).	Missense mutations in the catalytic domain, nonsense, deletions and splice mutations that cause loss activity. Neonates had severe mal-absorptive diarrhea and failure to thrive.	Screening identified from the UCLA Pediatric Diarrhea Research Database / USA.	[39]
	c.544-2A>G	Skipping of exon 5, the generation of a premature termination codon. Congenital diarrhea and polyuria.	Case report/Turkey	[40]

<b>MC4R/Melanocortin 4 receptor</b> Binding of MC4R to $\alpha$ -MSH leads to stimulation of receptor activity and suppression of food intake, AgRP has opposite effects.	Homozygous mutation c.947T>C (p.I316S), c.482T>C (p.M161T)	Deleterious protein with loss of function. Excessive bodyweight and hyperphagia.	Cohort of 73 Pakistani children with severe obesity from consanguineous families.	[23]
	237G>C (Met79Ile), 493C>T (Arg165Trp), 494G>A (Arg165Gln), 926T>A (Leu309Gln), 751A>C (Ile251Leu)	Change amino acid. BMI increased and family history of obesity.	Screening Case-control/ Norway	[37]
	Heterozygosity for S94N, C293R	Missense mutations with loss of function Progressive weight gain, hyperphagia, hyperinsulinemia.	Case report / Canada	[45]
	Homozygous mutation c.216C>A (N72 K)	Inactivation of receptor by aberrant retention in the cytoplasm. Early-onset obesity and hyperphagia	Case report/Netherlands	[46]
<b>SIM1/Single minded homologue 1</b> Transcription factor that controls target genes.	Novel heterozygous variant p.D134N	Predicted pathogenic. Severe obesity	Screening with 4 positive/ Slovak and Moravia	[48]
	Del 6q16.1. Deletion unknow, downstream of SIM1.	Variable developmental delay, intellectual disability, and susceptibility to obesity and hyperphagia.	10 probands-Six families/ UK	[49]
	Del 6q16. Deletion unknow	1.73 to 7.84 Mb. Severe obesity with Prader-Willi-like phenotype	8 patients positive/France	[50]
	c.886A>G (p.R296G), c.925A>G (p.S309G)	Loss of function. Develop delay and obesity	Screening 283 children with 2 positives/France	[51]

through the LEPR. Patients with functional deficiencies in LEPR have phenotypic similarities to LEP-deficient patients; they have rapid weight gain in the first few months of life, with severe hyperphagia and endocrine abnormalities [18]. These patients cannot benefit from recombinant leptin treatment because the receptor does not respond to its ligand; in these cases, serum leptin levels are high [19].

### Proopiomelanocortin (POMC)

The melanocortin system consists of proopiomelanocortin and its derived peptides  $\beta$  endorphin,  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , melanocyte stimulating hormone (MSH), and adrenocorticotrophic hormone (ACTH), which interact with different melanocortin receptors. The *POMC* gene is expressed in the hypothalamus, pituitary gland, and several peripheral tissues, including skin. Mutations that cause deficient signals in this pathway involve a wide range of processes, including regulation of body weight, adrenal steroidogenesis, and hair pigmentation [20]. Experimental studies in Labrador retriever dogs [21] and *in vitro* transcription of the *POMC* 11C>A mutation confirmed that loss-of-function causes obesity and predicts adrenal insufficiency [22]. Other mutations have also been described in consanguineous families [23-27].

### Proprotein convertase (PCSK1)

The proprotein convertase subtilisin kexin type 1 gene encodes proprotein convertase 1/3 (PC1/3), which is a neuroendocrine convertase that belongs to a family of subtilisin-like serine endoproteases and processes large precursor proteins into mature bioactive products [28]. This enzyme is tissue-specific and processes precursors within the regulated neuroendocrine secretory pathway. PC1 activity is essential for the activating cleavage of many peptide hormone precursors implicated in the regulation of food ingestion, glucose homeostasis, and energy homeostasis, such as proopiomelanocortin, proinsulin, proglucagon, and proghrelin. Rare mutations in *PCSK1* cause obesity, severe malabsorptive diarrhea, and endocrine abnormalities; even a heterozygous status causes obesity in several population studies. Löffler, et al. [29] reported elevated proinsulin levels and/or impaired glucose tolerance in children, and they found eight known variants and two novel heterozygous variants

(c.1095 + 1G >A and p.S24C) by sequencing the *PCSK1* gene. Patients with the new variants presented with extreme obesity and impaired glucose tolerance. Functionally, c.1095 + 1G > A mutation caused the skipping of exon 8 translation and a complete loss of enzymatic activity [30,31]. Similarly, Stijnen, et al. [32] reported common mutations and polymorphic variants associated with endocrinopathies and obesity.

### Melanocortin 4 receptor (MC4R)

The melanocortin 4 receptor is a G protein-coupled receptor that responds to an agonist,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) and to an antagonist/inverse agonist, agouti-related peptide (AgRP), both of which are released by upstream neurons. Binding to  $\alpha$ -MSH leads to stimulation of receptor activity and suppression of food intake, whereas AgRP has opposite effects [33]. *MC4R* is expressed in neurons of the hypothalamus and is essential for regulation of appetite and energy expenditure; its dysfunction in humans causes hyperphagia, impaired satiety, and obesity. Therefore, homozygous mutations are associated with severe obesity [34].

A study reported a novel human *MC4R* antagonist, Ipsen 17 that acted as a pharmacological chaperone of human *MC4R*. They tested it against 12 obesity-causing human *MC4R* variants, including S58C, E61K, N62S, I69T, P78 L, C84R, G98R, T162I, R165 W, W174C, C271Y, and P299H; Ipsen 17 was found to be the most universal pharmacological chaperone of *MC4R* because it can completely rescue the function of mutant receptors [35]. Other mutations have also been reported in several studies [36,37].

### Single-minded 1 (SIM1)

The *SIM1* gene belongs to the bHLH/PAS (basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim) family of transcription factors, which is characterized by an N-terminal bHLH domain required for DNA binding and dimerization and a PAS domain that acts as a secondary dimerization interface. Transcriptional control of target genes requires heterodimerization with another transcription factor, aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator, or a homolog prevalent in the central nervous system, ARNT2 [38]. Loss-of-function mutations in *SIM1* cause early-onset obesity and developmental delay, as observed in multiple different populations [39]. The phenotype has



also been reported to be very similar to that of Prader-Willi patients [40-42].

More details about the *LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *MC4R* and *SIMI* genes, types of mutation, phenotypes or biological effects, and type of studies are described in Table 1.

## Genes Involved in Polygenic and Multifactorial Obesity

In polygenic obesity, several genes have been analyzed by different approaches, such as the identification of polymorphisms in candidate genes, Genome Wide Association Studies (GWAS) and exome analysis, and case-control and cohort studies. Each approach has advantages and disadvantages. In the case of candidate gene studies, specific genes that have some biological association with the development of the disease are analyzed; however, the results in each population are generally different, generating inconsistencies that are re-analyzed by meta-analysis, though they are sometimes not comparable by ethnic stratification, sample size, and the methodologies used to identify polymorphisms [43].

In GWAS, the whole genome is analyzed, and the case vs. control variants are compared in order to identify the most frequent variants—these are risk genotypes. However, in most cases, the biological relationship of the gene with the disease is not found, or it is a variant in a non-coding region that requires detailed analysis. However, these studies have provided important evidence for the regulation of candidate genes by identifying polymorphic variants affecting promoter regions, enhancers, and alternative splicing sites. The first gene associated with polygenic obesity by GWAS was *FTO*, which is associated with fat tissue associated with obesity, confirmed in different age groups and populations of different ancestry [44].

More recently, massive sequencing techniques targeting the exome were developed to analyze functional variants that were identified in GWAS and may affect the structure-function of the encoded proteins. A recent GWAS meta-analysis of BMI in 339,224 adults identified 97 loci that accounted for approximately 2.7% of BMI variation. Although most GWAS have focused on polymorphic variants with relatively high frequency, few have been conducted on childhood obesity. Sabo, et al. [45] explored the contributions of both rare and common exonic variants to childhood obesity, and through whole genome analysis, they found a novel obesity gene, *PEX1*, in the VIVA LA FAMILIA cohort of 916 Hispanic children. The authors concluded that *PEX1* rs141510219 was strongly associated with multiple indices of obesity—weight, BMI, waist circumference, fat mass, and trunk fat mass and, despite its rarity, was found to be highly penetrant in the 10 affected children from three pedigrees.

In multifactorial polygenic obesity studies, there are often inconsistencies; results obtained in one population are not replicated in another, which can be attributed to several factors, including the pleiotropic effect of transcription factors that affect the differential expression of several target genes (e.g., *FTO* and *PPARG*) and the levels of circulating hormones that affect endocrine signaling in different pathways (e.g., leptin and insulin). Additionally, several studies have shown that these genes have cis and trans regulation. Trans regulation is generally induced by external factors, such as diet and exposure to various physical, chemical and/or biological agents,

and causes disease through the interaction between genetics and environment [46]. Interaction between multiple genes can result in epistasis, where the action of one gene affects another, such that the expected phenotype or association is not observed. Animal models have been used to understand such interactions in complex diseases like obesity [47].

The important characteristics of the most studied polymorphic genes, their biological or biochemical implications, and their association with obesity in children are described below. A more detailed analysis is shown in Table 2.

### Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ (*PPARG*)

*PPARG* is a member of the nuclear receptor superfamily that regulates the transcription of genes involved in cell growth, adipocyte differentiation, cholesterol and fatty acid metabolism, cell survival, ubiquitination, and adaptive thermogenesis. It is activated by lipophilic hormones, dietary fatty acids, and their metabolites [48]. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), the most common of which is Pro12Ala (rs1801282) in *PPARG2*, have been associated with obesity. These studies show that the Ala variant has lower DNA binding capacity and lower transactivation ability compared to the Pro variant [49]. Some *PPARG* polymorphisms have been associated with obesity and type 2 diabetes. In addition, differences in glucose, cholesterol, triglyceride levels, insulin resistance, and changes in anthropometric measurements have been found, though results between populations are variable [50-56].

### Adiponectin (*ADIPOQ*)

The *ADIPOQ* gene encodes the hormone adiponectin, which is produced exclusively in adipose tissue and released into plasma for distribution. Its receptors are mainly found in the liver and skeletal muscle, where it participates in the translocation of the glucose receptor and in the  $\beta$ -oxidation of fatty acids. Its transcription is dependent on *PPARG*, and the signaling cascade of adiponectin receptors promotes its transcription. Adiponectin levels are negatively associated with obesity and insulin resistance [57].

Several polymorphisms have been reported in non-coding and coding regions, including T-19148C, A-19119C, C-17760T, C-11377G, INS CA-11156, -7950G, C-4120A, 45TG and 276GT. Some of these SNPs have been associated with increased BMI and other anthropometric measures, as well as an increase in the level of adiponectin, the ratio of leptin/adiponectin, total cholesterol, HDL and LDL; therefore, they are considered to be risk genotypes for obesity and type 2 diabetes [58-63].

### Fat-mass and obesity associated gene (*FTO*)

The *FTO* gene is a nuclear protein of the AlkB-related non-heme iron and 2-oxoglutarate-dependent oxygenase superfamily, but the exact physiological function of this gene is not known. Other non-heme iron enzymes function to reverse alkylated DNA and RNA damage by oxidative demethylation [64]. Several polymorphisms in the gene have been associated with obesity in children and adults of different ethnicities; in addition, it has been related to increased BMI and related anthropometric measures, caloric intake, and compulsive hyperphagia behavior [65-70].

### Leptin (*LEP*)

Leptin is a lipo-regulating hormone produced primarily in

**Table 2:** Genetic factors associated with polygenic and multifactorial obesity in children.

Gene/Name	Polymorphism	Biological effect or frequency minor allele	Design studies	Reference
<b>PPARG</b>	Pro12Ala, 1431C>T	Pro12Ala was associated with a lower BMI. Poor COMPX was associated with the <i>PPARG</i> T1431 allele.	Prospective, 84 children aged 4 – 10 years / Scotland	[59]
	Pro12Ala	Homozygous <i>PPARG</i> 12Pro carriers had slightly higher total and LDL-cholesterol levels compared with carriers of 12Ala.	Prospective, 285 children aged 11 – 16 years / Sweden	[60]
	Pro12Ala	<i>PPARG</i> 12Ala-carriers presented higher glucose levels than Pro/Pro homozygotes.	Cohort of 325 children followed up from birth to 4 years old / Brazil	[61]
	Pro12Ala	Carriers of the Ala/Ala genotype had increased HOMA-IR compared to individuals with Pro/Pro + Ala/Pro genotypes.	Groups of obese children and a control group / Russian	[62]
	Several SNP in <i>PPARG</i>	Interaction between SNP's had a marginal association with dietary fats	Cohort European Diet, Obesity and Genes	[63]
	Pro12Ala	Low levels of triglycerides	Prospective, 215 children aged 6 – 12 years / Mexico	[64]
	Pro12Ala	Association between Pro12Ala genotype and fasting insulin, HOMA-IR and IR in children with high total cholesterol or LDL-cholesterol	Prospective, 1457 children aged 6–14 years / Mexico	[65]
<b>ADIPOQ</b>	G276T	Homozygous <i>ADIPOQ</i> 276 T/T had higher total and LDL-cholesterol levels compared with carriers of the 276 G allele.	Prospective, 285 children aged 11 – 16 years / Sweden	[60]
	SNPRs4632532 and rs182052	Effect on HDL cholesterol	Prospective, 215 children aged 6 – 12 years / Mexico	[64]
	SNP rs17300539	A variant was associated with higher adiponectin levels, this SNP may increase the risk for childhood obesity and insulin resistance.	Cohort of children of European origin, 1,852 children	[68]
	SNP rs1501299	Association with obesity	Meta-analysis: 62 reports	[69]
	SNP rs2241766	Association with overall obesity in adults	Case – Control study adult and cohort of children / Mexico	[70]
	-11377 C/G, +45 T/G and +276 G/T	G-G-T haplotype carriers had higher total and LDL cholesterol levels than non-carriers	Prospective, 687 children aged 7 – 11 years / Korea	[71]
	-11377C>G	Genotype G/C or G/G associated with obesity and 25% more leptin / adiponectin than C/C genotype	Prospective, 100 children aged 5–10 years	[72]
<b>FTO</b>	SNP rs9939609	Associated with obesity and anthropometric-related measures, total cholesterol and LDL.	Prospective, 215 children aged 6 – 12 years / Mexico	[64]
	SNP rs9939609	No association with BMI in children	Prospective, 1218 children aged 6 – 15 years / Mexico	[70]
	SNPRs9939609, rs17817449	SNP rs9939609 AA genotype was associated with obesity and carriers of rs17817449 SNP had higher values of weight, body mass index, waist and hip circumference, total cholesterol, triglycerides, adiponectin, and fasting glucose.	Prospective, 387 children aged 1 – 18 years / Romania	[74]
	SNP rs9939609	Improvement of measured obesity related after physical intervention	Intervention study: 36 school children / Brazil	[75]
	SNP rs9939609	No association with obesity or overweight	Case – Control study: 153 controls and 195 obese/overweight children / Brazil	[76]
	SNP rs9939609	Associated with obesity and high BMI in children with familiar history of obesity	Prospective, 406 children aged 7 – 17 years / Brazil	[77]
	SNP rs9939609	Association between disorder of corporeality and emotional eating was found only in A-allele carriers	Case – control study, 250 Eating Disorders patients aged 18 – 60 years and 119 controls / Italia	[78]
	SNP rs9939609	<i>FTO</i> genotype was associated with greater caloric consumption	Randomized experiment, 200 children aged 9-10 years	[79]
<b>LEP</b>	G-2548	No association with obesity or related parameters	Meta-analysis: 62 reports	[69]
	G-2548A, A19G	Association with weight, height, BMI, WC, HDL cholesterol and serum leptin levels	Case – Control study, 475 subjects aged 10 – 78 / Pakistan	[81]
	G-2548A	Association with BMI, WC, HC, fasting blood glucose and serum leptin levels	Case – control study, 394 subjects aged 5 – 45 years	[82]
	G-2548A, A19G	Genotypes GG(19A>G) and AA (2548G>A) had lowest relative mRNA level and serum leptin concentration	Prospective, 48 children aged 9 – 15 years / Poland	[83]
	G-2548A	Association with variations in leptin levels, BMI and HC, G allele was associated with overweight in girls	Prospective, 880 healthy children aged 12-16 years	[84]
	G-2548A	Association inconclusive with overweight/obesity and the related metabolic disturbances. The results may be due to unidentified gene-environment interactions	Review: 24 studies	[85]
	G-2548A, A19G	No significant differences between <i>LEP</i> polymorphisms and serum leptin levels	Prospective cross-sectional 80 healthy Caucasian infants under 6 months of age	[86]

adipose tissue, where it maintains intracellular lipid homeostasis. Upon binding to its receptor, it initiates a signaling cascade to decrease the activity of lipogenic transcription factors, primarily *PPARG* in the liver and the *SRBP-1C* sterol regulatory element carrier protein, thus inducing the decrease of lipogenic enzymes [71]. Several polymorphisms have been described in the gene, but the

most studied is G-2548A, which has been associated with obesity, low circulating leptin levels (GA genotype, AA), increased BMI, and other anthropometric measures [72-77].

### Leptin receptor (*LEPR*)

*LEPR* is expressed in different tissues and exerts its function in the hypothalamus via the *JAK/STAT* pathway to promote the

transcription of genes encoding anorexigenic proteins, such as alpha-melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH), the transcript regulated by cocaine and amphetamine (CART) and corticotropin releasing hormone (CRH), thus initiating leptin-induced satiety signal [71]. Several *LEPR* polymorphisms have been associated with obesity, increased BMI and anthropometric measures, and alterations in leptin, adiponectin, insulin and elevated cholesterol levels [78–85].

## Extrinsic Factors Involved in Obesity: Environment Agents

Environmental factors such as physical activity, nutritional status, and an intake of foods rich in fats and carbohydrates favor an obesity in children. In addition, several chemical compounds have been described as potential endocrine disruptors that increase BMI and lead to obesity, and some biological agents alter the homeostasis of adipose tissue. These factors are part of multifactorial obesity.

### Diet and physical activity

Through diet, energy is acquired in the form of macronutrients (carbohydrates, proteins, and lipids) and micronutrients (vitamins and minerals). The composition of the diet determines the accumulation of adipose tissue, not only the number of calories that a food contributes but also the type of macronutrient those calories come from; however, controversy remains. A diet rich in fats and lipids, compared with a diet rich in another macronutrient with the same caloric component, stimulates the transcription of genes involved in adipogenesis [86]. This has been observed in randomized clinical trials, where a low-fat diet leads to weight reduction, but the results are variable among cohort studies [87].

A review of different cohort, intervention, or transverse studies on carbohydrates explored the controversy over the intake of beverages with added sugar and the risk of overweight and obesity in childhood, independent of age, sex, ethnicity, and physical activity [88]. In the Avon Longitudinal Study of Parents and Children - Bristol University cohort, it was found that food with added sugar increased energy intake and was associated with overweight and obesity in children and adolescents [89]. On the other hand, high protein intake may also increase the risk of overweight and obesity, as shown in a randomized study in which a low-protein diet reduced the risk of obesity at age 6 [90]; in The Environmental Determinants of Diabetes in the Young Study, energy intake and protein amount increased the risk of obesity in 5.5-year-old children [91].

An important factor in the excessive consumption of macronutrients are ultra-processed foods and fast food, where most of the ingredients are sugars and saturated fats, with little nutritional quality. In Brazil, the Household Budget Survey showed a high risk of obesity (OR= 3.72) in people who had ultra-processed foods in their homes [92]. In Saudi Arabia and China, an increase in overweight and obesity has been observed mainly in regions that have become westernized and have fast food chains [93,94].

Another factor in the development of obesity is energy expenditure, which includes basal metabolic expenditure, the thermal effect of food, and physical activity. The recommended activity for children ages 5 to 18 is a minimum of 60 minutes per day of moderate to vigorous physical activity, and children under 6 years of age should engage in at least 3 hours per day of play and exercise [95].

Various studies in both adults and children and adolescents suggest a minimum of 180 minutes of physical activity per week [96].

Similar results have been reported in children from Sweden [97] and Finland [98], where moderate to vigorous physical activity for one year was associated with an increase in muscle mass and better physical or cardiorespiratory fitness in children. In the International Study of Childhood Obesity, Lifestyle and the Environment and ENERGY project, there was an association between moderate to vigorous physical activity and a lower risk of obesity and lower anthropometric measures independent of other sedentary behavior [99,100] or birth weight [101].

### Chemical compounds as endocrine disruptors

*In vitro*, animal and epidemiological evidence has shown interference of some chemical contaminants with hormone pathways, which may result in endocrine disorders such as obesity and type 1 and type 2 diabetes. Exposure to these Chemical Endocrine Disruptors (CEDs) can be through ingestion, inhalation, injection, transdermal contact, or during gestation. In cell culture and animal models, chemical contaminants such as tributyltin, diethylstilbestrol, 4-nonylphenol, and mono-2 ethylhexylphthalate have been observed to promote adipogenesis through interaction with PPAR, C/EBP $\beta$ , aP2, and LPL [102].

Some studies in different cohorts of the European Union found that the CEDs Dichloro-Diphenyl-Dichloro-Ethylene (DDE), bisphenol A (BPA), and phthalates contributed significantly to the development of obesity and type 2 diabetes in early childhood and even in adulthood [103]. In cohort studies from Greece [104], they found an association between exposure to polychlorinated biphenols, as measured by urinary levels of BPA, with higher anthropometric measures, elevated blood pressure, and obesity in children aged 4 years; however, no association was found with prenatal exposure [105]. In two different cohorts of Denmark (Faroe Islands), they found an association between exposure to organochlorines and higher levels of insulin in girls but not in boys [106], and levels of perfluorooctanoic acid and perfluorooctyl sulfonate in maternal serum were associated with obesity in children at 18 months and 5 years of age [107]. In addition to the observed effects of each pollutant, in a cohort of pregnant women in Spain, the concentration of 27 contaminants was measured, and exposure to organochlorines was associated with obesity in children 7 years of age [108]. However, there are inconsistent results in the CHAMACOS cohort of children born in the USA to Mexican mothers who were exposed to dicloro difenil tricloroetano and dietilestilbestrol during pregnancy but not after birth; in this study, there was no association with obesity, but rather with low growth in girls [109].

In the birth cohort Columbia Center for Children's Environmental Health, they found an association between urinary levels of BPA with fat percentage and waist circumference at 7 years of age [110]. In obese children, an inverse correlation was found between urinary levels of BPA and levels of adiponectin; adipocytes extracted from these same children showed a low expression of adiponectin and increased expression of resistin when treated with BPA [111]. However, in the Mount Sinai Children's Environmental Health Study cohort, there was no association between urinary levels of BPA and triclosan and obesity, but 2,5-dichlorophenol was associated with



the highest percentage of fat, while levels of benzophenone-3 were associated with a lower percentage of fat in girls. Most of the evidence indicates an association between exposure to chemical contaminants and an increased risk of obesity, and different results may be due to the genetic structure of populations as well as other environmental factors.

Metallic elements generally exist in the environment and in food. Although the metallic elements in the human body are usually in small quantities, some of them play important biological roles in enzymes, hormones, vitamins, and normal metabolism [112]. Recently, Fan et al. [113], used the National Health and Nutrition Examination Survey data from 2011-2014 to investigate the relationships between serum metallic elements (Cu, Zn, Mn, Pb, Hg, and Se) and BMI, triglyceride, low density lipoprotein cholesterol, cholesterol, insulin, and the homeostasis model assessment of insulin resistance index (HOMA-IR), in 5404 children and adolescent subjects 6-19 years of age. This study reported significant associations between the highest quartile of copper concentrations in blood with obesity status and cholesterol; the highest concentrations of manganese in the blood were associated with obesity in those aged 6-19 years. Moreover, blood mercury and selenium showed positive relationships with cholesterol. Further, a negative association existed between lead and zinc in blood, and obesity was observed.

On the other hand, arsenic is an endocrine disruptor that although has been recognized as a risk factor for type 2 diabetes with [114], it is still uncertain whether arsenic is also an obesogen. The currently available information suggests that arsenic can negatively affect white adipose tissue metabolism resulting a potential obesogen [115].

### Biological agents associated with obesity

Another environmental factor that has recently been studied is the human adenovirus type 36 (Ad36). Ad36 induces adipogenesis by increasing: 1) cell membrane glucose receptors (Glut4 and Glut1), leading to an increase in intracellular glucose independent of insulin; 2) enzymatic activity of acetyl Co-A carboxylase-1 and fatty acid synthase, which converts glucose into fatty acids; and 3) transcription of the PPAR $\gamma$  and C/EBP $\beta$  genes, which are involved in the differentiation of stem cells into adipocytes [116-118]. In addition, it diminishes the expression of genes involved in  $\beta$  oxidation [119].

In animals and humans, it has been observed that Ad36 participates in increasing body fat [120-122] in addition to decreasing the effect of diet and exercise on weight loss in children and teenagers. However, it has been associated with lower levels of glucose, total cholesterol, non-esterified fatty acids, and insulin levels [123,124]. Weight loss has been different in the case of adults, where a greater decrease has been reported in those who were seropositive for Ad36 after non-pharmacological treatment [125]. Ad36 infection has been associated with increased levels of leptin [126] and lower levels of adiponectin, as well as increased pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, VEGF, and MCP1 [127-129].

In meta-analyses, which included individuals of different nationalities and different methods of antibody determination against Ad36, an increased risk of obesity was found in seropositive subjects, higher in the case of children, but this was not associated with glucose levels, lipid profile, or blood pressure [130-132]. In the Family Heart

Study, Ad36 infection was associated with higher adiposity and better glycemic control in a 10-year follow-up study in children who were seropositive for Ad36 [133,134]. However, in the Cardiovascular Risk in Young Finns Study, after 30 years of follow-up, there was no association between being seropositive in childhood and weight gain in adulthood, but a cross-sectional association was found between seropositive individuals and higher prevalence of obesity [135].

Metabolic disorders and obesity are closely linked to lifestyle and diet, and obesity also is associated with microbial dysbiosis, decreased intestinal barrier function, gut inflammation, metabolic endotoxemia, chronic low-grade systemic inflammation, and desensitization of vagal afferent nerves. The gut microbiota is a complex community of bacteria residing in the intestine. Animal models have demonstrated that several factors contribute to and can significantly alter the composition of the gut microbiota, including genetics, the mode of delivery at birth, the method of infant feeding, the use of medications, especially antibiotics, and diet [136]. Recent evidence suggests that altered gut microbiota, together with decreased gut barrier function, allows for the passage of bacterial components or metabolites in obese individuals, leading to the disruption of vagal afferent signaling and consequently resulting in further increases in body weight [137].

In healthy individuals, bacterial translocation is blocked by a single layer of highly specialized intestinal epithelial cells that form a strong barrier lining the gut wall. This structure is responsible for the efficient absorption of nutrients, but in susceptible individuals, for incompletely understood reasons, either defective epithelial barrier function or dysregulated microbial composition or microbial pathogens drive intestinal inflammation [138]. In addition, intestinal microbiota can be modulated by a high-fat diet that induces intestinal dysbiosis through changes in composition and distribution of bacteria [139]. Other studies have reported that prebiotics and probiotics are a safe and effective dietary substance that can therapeutically alter the gut microbiota of the host to improve the health of obese subjects [140]. Finally, several studies have demonstrated the ability of parasites to alter microbial communities within their shared niche, leading to alterations in inflammatory processes. Few reports have addressed how these changes to the microbiome may be a mechanism by which parasites influence not only inflammation but also metabolic states [141].

### Conclusion

Obesity is a pandemic that has reached alarming levels and gravely concerns government health systems because of its association with other chronic degenerative diseases that represent high costs in health services. The infant population is especially vulnerable and, although monogenic obesity mainly affects children, its frequency is very low compared with multifactorial polygenic obesity, which involves several polymorphic genes related to obesity and their interaction with environmental factors. These include diet, physical exercise, distribution of nutrients, the role of the microbiome, and the presence of other biological agents such as viruses and parasites; in addition, exposure to chemical contaminants can alter gene expression or nutrient distribution. It is necessary to develop comprehensive strategies that consider several elements (genetic and environmental) that can lead a population to a state of obesity in order to control and prevent their complications.

## References

- Huvenne H, Dubern B. Monogenic Forms of Obesity. Nóbrega C, Rodríguez López R editors. In: Molecular mechanisms underpinning the development of obesity. Springer International Publishing Switzerland. 2012; 9-18.
- Hetherington M, Cecil J. Gene-Environment Interactions in Obesity. Langhans W, Geary N editors. In: Frontiers in Eating and Weight Regulation. Forum Nutr. Basel, Karger, 2010; 63: 195-203.
- Yeow NA, Bee SW, Bee KP, Mohd NI. Multifactorial Influences of Childhood Obesity. *Curr Obes Rep.* 2013; 2: 10-22.
- Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis.* 2016; 15: 108.
- Lakshman R, Elks CE, Ong KK. Childhood obesity. *Circulation.* 2012; 126: 1770-1779.
- Withrow D, Alter D. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes Rev.* 2011; 12: 131-141.
- Tremmel M, Gerdtham U, Nilsson PM, Saha S. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2017; 14: E435.
- Commission on Ending Childhood Obesity. Report of the Commission on Ending Childhood Obesity. Geneva: World Health Organization, 2016.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico OCDE, Obesity Update. 2017.
- Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2014; 384: 766-781.
- Wasim M, Awan FR, Najam SS, Khan AR, Khan HN. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. *Biochem Genet.* 2016; 54: 565-572.
- Stern JH, Rutkowski JM, Scherer PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab.* 2016; 23: 770-784.
- Shabana, Hasnain S. The p. N103K mutation of leptin (LEP) gene and severe early onset obesity in Pakistan. *Biol Res.* 2016; 49: 23.
- Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Shabir F, Ayesha H, Philippe J. Genetic variants in LEP, LEPR, and MC4R explain 30% of severe obesity in children from a consanguineous population. *Obesity (Silver Spring).* 2015; 23: 1687-1695.
- Mazen I, Amr K, Tantawy S, Farooqi IS, El Gammal M. A novel mutation in the leptin gene (W121X) in an Egyptian family. *Mol Genet Metab Rep.* 2014; 1: 474-476.
- Altawil AS, Mawlawi HA, Alghamdi KA, Almjimaj FF. A Novel Homozygous Frameshift Mutation in Exon 2 of LEP Gene Associated with Severe Obesity: A Case Report. *Clin Med Insights Pediatr.* 2016; 10: 115-118.
- Wabitsch M, Funcke JB, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin KM, et al. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1266-1267.
- Le Beyec J, Cugnet-Anceau C, Pépin D, Alili R, Cotillard A, Lacorte JM. Homozygous leptin receptor mutation due to uniparental disomy of chromosome 1: response to bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98: E397-E402.
- Dubern B1, Clement K. Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie.* 2012; 94: 2111-2115.
- González E, Aguilar MJ, Padilla CA, García I. Monogenic human obesity: role of the leptin-melanocortin system in the regulation of food intake and body weight in humans. *An Sist Sanit Navar.* 2012; 35: 285-293.
- Mankowska M, Krzeminska P, Graczyk M, Switonski M. Confirmation that a deletion in the POMC gene is associated with body weight of Labrador Retriever dogs. *Res Vet Sci.* 2017; 112: 116-118.
- Anisimova AS, Rubtsov PM, Akulich KA, Dmitriev SE, Frolova E, Tiulpakov A. Late Diagnosis of POMC Deficiency and *In Vitro* Evidence of Residual Translation From Allele With c.-11C>A Mutation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102: 359-362.
- Shabana, Hasnain S. Prevalence of POMC R236G mutation in Pakistan. *Obes Res Clin Pract.* 2016; 10 Suppl 1: S110-S116.
- Özen S, Özcan N, Uçar SK, Gökseken D, Darcan S. Unexpected clinical features in a female patient with Proopiomelanocortin (POMC) deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015; 28: 691-694.
- Aslan IR, Ranadive SA, Valle I, Kollipara S, Noble JA, Vaisse C. The melanocortin system and insulin resistance in humans: insights from a patient with complete POMC deficiency and type 1 diabetes mellitus. *Int J Obes (Lond).* 2014; 38: 148-151.
- Cirillo G, Marini R, Ito S, Wakamatsu K, Scianguetta S, Bizarri C, et al. Lack of red hair phenotype in a North-African obese child homozygous for a novel POMC null mutation: nonsense-mediated decay RNA evaluation and hair pigment chemical analysis. *Br J Dermatol.* 2012; 167: 1393-1395.
- Hung CN, Poon WT, Lee CY, Law CY, Chan AY. A case of early-onset obesity, hypocortisolism, and skin pigmentation problem due to a novel homozygous mutation in the proopiomelanocortin (POMC) gene in an Indian boy. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2012; 25: 175-179.
- Nordang GBN, Busk ØL, Tveten K, Hanevik HI, Fell AKM, Hjelmæsæth J, et al. Next-generation sequencing of the monogenic obesity genes LEP, LEPR, MC4R, PCSK1 and POMC in a Norwegian cohort of patients with morbid obesity and normal weight controls. *Mol Genet Metab.* 2017; 121: 51-56.
- Löffler D, Behrendt S, Creemers J, Klammt J, Aust G, Stanik J. Functional and clinical relevance of novel and known PCSK1 variants for childhood obesity and glucose metabolism. *Mol Metab.* 2017; 6: 295-305.
- Martín MG, Lindberg I, Solorzano-Vargas RS, Wang J, Avitzur Y, Bandsma R, et al. Congenital proprotein convertase 1/3 deficiency causes malabsorptive diarrhea and other endocrinopathies in a pediatric cohort. *Gastroenterology.* 2013; 145: 138-148.
- Härter B, Fuchs I, Müller T, Akbulut UE, Cakir M, Janecke AR. Early Clinical Diagnosis of PC1/3 Deficiency in a Patient With a Novel Homozygous PCSK1 Splice-Site Mutation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 62: 577-580.
- Stijnen P, Ramos-Molina B, O'Rahilly S, Creemers JW. PCSK1 Mutations and Human Endocrinopathies: From Obesity to Gastrointestinal Disorders. *Endocrine Rev.* 2016; 37: 347-371.
- Granel S, Molden BM, Baldini G. Exposure of MC4R to agonist in the endoplasmic reticulum stabilizes an active conformation of the receptor that does not desensitize. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: E4733-E4742.
- Hainerová IA, Lebl J. Treatment options for children with monogenic forms of obesity. *World Rev Nutr Diet.* 2013; 106: 105-112.
- Wang XH, Wang HM, Zhao BL, Yu P, Fan ZC. Rescue of defective MC4R cell-surface expression and signaling by a novel pharmacoperone Ipsen 17. *J Mol Endocrinol.* 2014; 53: 17-29.
- Doulla M, McIntyre AD, Hegele RA, Gallego PH. A novel MC4R mutation associated with childhood-onset obesity: A case report. *Paediatr Child Health.* 2014; 19: 515-518.
- Delhanty PJ, Bouw E, Huisman M, Vervenne RM, Themmen AP, van der Lely AJ, et al. Functional characterization of a new human melanocortin-4 receptor homozygous mutation (N72K) that is associated with early-onset obesity. *Mol Biol Rep.* 2014; 41: 7967-7972.
- Wang X, Wei W, Zinn AR, Wan Y. Sim1 inhibits bone formation by enhancing the sympathetic tone in male mice. *Endocrinology.* 2015; 156: 1408-1415.
- Stanikova D, Buzga M, Krumpolec P, Skopkova M, Surova M, Ukropcova B, et al. Genetic analysis of single-minded 1 gene in early-onset severely obese children and adolescents. *PLoS One.* 2017; 12: e0177222.
- Kasher PR, Schertz KE, Thomas M, Jackson A, Annunziata S, Ballesta-Martinez MJ, et al. Small 6q16.1 Deletions Encompassing POU3F2 Cause


- Susceptibility to Obesity and Variable Developmental Delay with Intellectual Disability. *Am J Hum Genet.* 2016; 98: 363-372.
41. El Khattabi L, Guimiot F, Pipiras E, Andrieux J, Baumann C, Bouquillon S, et al. Incomplete penetrance and phenotypic variability of 6q16 deletions including SIM1. *Eur J Hum Genet.* 2015; 23: 1010-1018.
  42. Montagne L, Raimondo A, Delobel B, Duban-Bedu B, Noblet FS, Dechaume A, et al. Identification of two novel loss-of-function SIM1 mutations in two overweight children with developmental delay. *Obesity (Silver Spring).* 2014; 22: 2621-2624.
  43. Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20: 396-406.
  44. Loos RJ, Yeo GS. The bigger picture of FTO: the first GWAS-identified obesity gene. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10: 51-61.
  45. Sabo A, Mishra P, Dugan-Perez S, Voruganti S, Kent J, Kalra D. Exome Sequencing Reveals Novel Genetic Loci Influencing Obesity-Related Traits in Hispanic Children. *Obesity.* 2017; 25: 1270-1276.
  46. Heianza Y, Qi L. Gene-Diet Interaction and Precision Nutrition in Obesity. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: 787.
  47. Attie AD, Churchill GA, Nadeau JH. How mice are indispensable for understanding obesity and diabetes genetics. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017; 24: 83-91.
  48. Brun J, Berthou F, Trajkovski M, Maechler P, Foti M, Bonnet N. Bone Regulates Browning and Energy Metabolism Through Mature Osteoblast/Osteocyte PPAR $\gamma$  Expression. *Diabetes.* 2017; 170116.
  49. He W. PPAR $\gamma$ 2 polymorphism and human health. *PPAR Research.* 2009. Article ID 849538, 15 pages.
  50. Cecil JE, Palmer CN, Fischer B, Watt P, Wallis DJ, Murrie I, et al. Variants of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma- and beta-adrenergic receptor genes are associated with measures of compensatory eating behaviors in young children. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86: 167-173.
  51. Johansson LE, Danielsson P, Norgren S, Marcus C, Ridderstråle M. Interaction between PPARG Pro12Ala and ADIPOQ G276T concerning cholesterol levels in childhood obesity. *Int J Pediatr Obes.* 2009; 4: 119-125.
  52. Zandoná MR, Rodrigues RO, Albiero G, Campagnolo PD, Vitolo MR, Almeida S, et al. Polymorphisms in LEPR, PPARG and APM1 genes: associations with energy intake and metabolic traits in young children. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2013; 57: 603-611.
  53. Dubinina IA, Chistiakov DA, Eremina IA, Brovkin AN, Zilberman LI, Nikitin AG, et al. Studying progression from glucose intolerance to type 2 diabetes in obese children. *Diabetes Metab Syndr.* 2014; 8: 133-137.
  54. Larsen SC, Ångquist L, Østergaard JN, Ahluwalia TS, Vimalaswaran KS, Roswall N, et al. Intake of Total and Subgroups of Fat Minimally Affect the Associations between Selected Single Nucleotide Polymorphisms in the PPAR $\gamma$  Pathway and Changes in Anthropometry among European Adults from Cohorts of the DiOGenes Study. *J Nutr.* 2016; 146: 603-611.
  55. Muñoz-Yáñez C, Pérez-Morales R, Moreno-Macías H, Calleros-Rincón E, Ballesteros G, González RA et al. Polymorphisms FTO rs9939609, PPARG rs1801282 and ADIPOQ rs4632532 and rs182052 but not lifestyle are associated with obesity related-traits in Mexican children. *Genet Mol Biol.* 2016; 39: 547-553.
  56. Stryjecki C, Peralta-Romero J, Alyass A, Karam-Araujo R, Suarez F, Gomez-Zamudio, et al. Association between PPAR- $\gamma$ 2 Pro12Ala genotype and insulin resistance is modified by circulating lipids in Mexican children. *Sci Rep.* 2016; 14: 24472.
  57. Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci.* 2016; 17.
  58. Johansson LE, Danielsson P, Norgren S, Marcus C, Ridderstråle M. Interaction between PPARG Pro12Ala and ADIPOQ G276T concerning cholesterol levels in childhood obesity. *Int J Pediatr Obes.* 2009; 4: 119-125.
  59. Morandi A, Maffei C, Lobbens S, Bouatia-Naji N, Heude B, Pinelli L, et al. Early detrimental metabolic outcomes of rs17300539-A allele of ADIPOQ gene despite higher adiponectinemia. *Obesity (Silver Spring).* 2010; 18: 1469-1473.
  60. Yu Z, Han S, Cao X, Zhu C, Wang X, Guo X. Genetic polymorphisms in adipokine genes and the risk of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity (Silver Spring).* 2012; 20: 396-406.
  61. León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, et al. Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in Mexican children and adults. *PLoS One.* 2013; 8: e70640.
  62. Park JY, Lee HJ, Jang HB, Hwang JY, Kang JH, Han BG, et al. Interactions between ADIPOQ gene variants and dietary monounsaturated: saturated fatty acid ratio on serum lipid levels in Korean children. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014; 24: 83-90.
  63. Gajewska J, Kurylowicz A, Ambroszkiewicz J, Mierzejewska E, Chelchowska M, Szamotulska J, et al. ADIPOQ -11377C>G Polymorphism Increases the Risk of Adipokine Abnormalities and Child Obesity Regardless of Dietary Intake. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 62: 122-129.
  64. Yang Q, Xiao T, Guo J, Su Z. Complex Relationship between Obesity and the Fat Mass and Obesity Locus. *Int J Biol Sci.* 2017; 13: 615-629.
  65. Duicu C, Marginean CO, Voidazan S, Tripon F, Banescu C. FTO rs 9939609 SNP Is Associated With Adiponectin and Leptin Levels and the Risk of Obesity in a Cohort of Romanian Children Population. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95: e3709.
  66. Moraes GG, Reuter CP, Renner JD, Klinger EI, Ferreira MB, Mello ED. Genotypic carriers of the obesity-associated FTO polymorphism exhibit different cardio metabolic profiles after an intervention. *An Acad Bras Cienc.* 2016; 88: 2331-2339.
  67. Pereira P, Alvim-Soares AM, Sandrim VC, Lanna CM, Souza-Costa DC, Belo Vde A, et al. Lack of association between genetic polymorphism of FTO, AKT1 and AKTIP in childhood overweight and obesity. *J Pediatr (Rio J).* 2016; 92: 521-527.
  68. Reuter CP, Burgos MS, Bernhard JC, Tornquist D, Klinger EI, Borges TS, et al. Association between overweight and obesity in schoolchildren with rs9939609 polymorphism (FTO) and family history for obesity. *J Pediatr (Rio J).* 2016; 92: 493-498.
  69. Castellini G, Franzago M3 Bagnoli S1 Lelli L1 Balsamo M3 Mancini M, et al. Fat mass and obesity-associated gene (FTO) is associated to eating disorders susceptibility and moderates the expression of psychopathological traits. *PLoS One.* 2017; 12: e0173560.
  70. Gilbert-Diamond D, Emond JA, Lansigan RK, Rapuano KM, Kelley WM, Heatherton TF, et al. Television food advertisement exposure and FTO rs9939609 genotype in relation to excess consumption in children. *Int J Obes (Lond).* 2017; 41: 23-29.
  71. Triantafyllou GA, Paschou SA, Mantzoros CS. Leptin and Hormones: Energy homeostasis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2016; 45: 633-645.
  72. Shabana, Hasnain S. Leptin promoter variant G2548A is associated with serum leptin and HDL-C levels in a case control observational study in association with obesity in a Pakistani cohort. *J Biosci.* 2016; 41: 251-255.
  73. Shahid A1, Rana S, Mahmood S, Saeed S. Role of leptin G-2548A polymorphism in age- and gender-specific development of obesity. *J Biosci.* 2015; 40: 521-530.
  74. Cieslak J, Bartz M, Stachowiak M, Skowronska B, Majewska KA, Harasymczuk J, et al. Effect of three common SNPs in 5'-flanking region of LEP and ADIPOQ genes on their expression in Polish obese children and adolescents. *Mol Biol Rep.* 2012; 39: 3951-3955.
  75. Riestra P, Garcia-Anguita A, Vitorro E, Schoppen S, de Oya M, Garcés C. Influence of the leptin G-2548A polymorphism on leptin levels and anthropometric measurements in healthy Spanish adolescents. *Ann Hum Genet.* 2010; 74: 335-339.
  76. Ghalandari H, Hosseini-Esfahani F, Mirmiran P. The Association of Polymorphisms in Leptin/Leptin Receptor Genes and Ghrelin/Ghrelin



- Receptor Genes With Overweight/Obesity and the Related Metabolic Disturbances: A Review. *Int J Endocrinol Metab.* 2015; 13: e19073.
77. Savino F, Sardo A, Montanari P, Galliano I, Di Stasio L, Bergallo M, et al. Polymorphisms in *Lep* and *Lepr* Genes in Infants: Correlation with Serum Leptin Values in the First 6 Months of Life. *J Am Coll Nutr.* 2017; 19: 1-6.
  78. Suazo J, Hodgson MJ, Obregón AM, Valladares M, Weisstaub G, Amador P, et al. Prevalence of metabolic syndrome in obese Chilean children and association with gene variants of the leptin-melanocortin system. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2013; 26: 1131-1139.
  79. Angel-Chávez LI, Tene-Pérez CE, Castro E. Leptin receptor gene K656N polymorphism is associated with low body fat levels and elevated high-density cholesterol levels in Mexican children and adolescents. *Endocr Res.* 2012; 37: 124-134.
  80. Komsu-Ornek Z, Demirel F, Dursun A, Ermis B, Piskin E, Bideci A. Leptin receptor gene Gln223Arg polymorphism is not associated with obesity and metabolic syndrome in Turkish children. *Turk J Pediatr.* 2012; 54: 20-24.
  81. Tabassum R, Mahendran Y, Dwivedi OP, Chauhan G, Ghosh S, Marwaha RK, et al. Common variants of *IL6*, *LEPR*, and *PBEF1* are associated with obesity in Indian children. *Diabetes.* 2012; 61: 626-31.
  82. Pena G, Guimarães AL, Veloso RR, Reis TC, Gomes CS, Neto JF, et al. Leptin Receptor Gene Gln223Arg Polymorphism Is Not Associated with Hypertension: A Preliminary Population-Based Cross-Sectional Study. *Cardiol Res Pract.* 2014: 879037.
  83. Répásy J, Bokor S, Erhardt É, Molnár D. Association of Gln223 Arg polymorphism of the leptin receptor gene with indicators of energy expenditure in obese children. *Nutrition.* 2014; 30: 837-840.
  84. Queiroz EM, Cândido AP, Castro IM, Bastos AQ, Machado-Coelho GL, Freitas RN. *IGF2*, *LEPR*, *POMC*, *PPARG*, and *PPARGC1* gene variants are associated with obesity-related risk phenotypes in Brazilian children and adolescents. *Braz J Med Biol Res.* 2015; 48: 595-602.
  85. Marginean C, Marginean CO, Iancu M, Szabo B, Cucerea M, Melit LE, et al. The role of *TGF-β1 869 T > C* and *PPAR γ2 34 C > G* polymorphisms, fat mass, and anthropometric characteristics in predicting childhood obesity at birth: A cross-sectional study according the parental characteristics and newborn's risk for child obesity (the newborns obesity's risk) NOR study. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95: e4265.
  86. Knouff C, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev.* 2004; 25: 899-918.
  87. Hooper L, Abdelhamid A, Bunn D, Brown T, Summerbell CD, Skeaff CM. Effects of total fat intake on body weight. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(8): CD011834.
  88. Trumbo PR, Rivers CR. Systematic review of the evidence for an association between sugar-sweetened beverage consumption and risk of obesity. *Nutr Rev.* 2014; 72: 566-574.
  89. Emmett P, Jones LR. Diet, growth, and obesity development throughout childhood in the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *Nutr Rev.* 2015; 73: 175-206.
  90. Weber M, Grote V, Closa-Monasterolo R, Escribano J, Langhendries JP, Dain E et al. Lower protein content in infant formula reduces BMI and obesity risk at school age: follow-up of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99: 1041-51.
  91. Beyerlein A, Uusitalo UM, Virtanen SM, Vehik K, Yang J, Winkler C, et al. Intake of Energy and Protein is Associated with Overweight Risk at Age 5.5 Years: Results from the Prospective TEDDY Study. *Obesity (Silver Spring).* 2017;25:1435-1441.
  92. Canella DS, Levy RB, Bortoletto Martins AP, Moreira Claro R, Moubarac JC, Galastri Baraldi L, et al. Ultra-Processed Food Products and Obesity in Brazilian Households (2008-2009). *PLoS One.* 2014; 9: e92752.
  93. DeNicola E, Aburizaiza OS, Siddique A, Khwaja H, Carpenter DO. Obesity and public health in the Kingdom of Saudi Arabia. *Rev Environ Health.* 2015; 30: 191-205.
  94. Zhai FY, Du SF, Wang ZH, Zhang JG, Du WW, Popkin BM. Dynamics of the Chinese Diet and the Role of Urbanicity, 1991-2011. *Obes Rev.* 2014; 15: 16-26.
  95. O'Malley G, Ring-Dimitriou S, Nowicka P, Vania A, Frelut ML, Farpour-Lambert N, et al. Physical Activity and Physical Fitness in Pediatric Obesity: What are the First Steps for Clinicians? Expert Conclusion from the 2016 ECOG Workshop. *Int J Exerc Sci.* 2017; 10: 487-496. eCollection 2017.
  96. Aguilar Cordero MJ, Ortegon Pinero A, Mur Vilar N, Sanchez Garcia JC, Garcia Verazaluze JJ, Garcia Garcia I, et al. Physical activity programmes to reduce overweight and obesity in children and adolescents; a systematic review. *Nutr Hosp.* 2014; 30: 727-740.
  97. Leppänen MH, Henriksson P, Nyström CD, Henriksson H, Ortega FB, Pomeroy J, et al. Longitudinal Physical Activity, Body Composition, and Physical Fitness in Preschoolers. *Med Sci Sports Exerc.* 2017; 49: 2078-2085.
  98. Collings PJ, Westgate K, Väistö J, Wijndaele K, Atkin AJ, Haapala EA, et al. Cross-Sectional Associations of Objectively-Measured Physical Activity and Sedentary Time with Body Composition and Cardiorespiratory Fitness in Mid-Childhood: The PANIC Study. *Sports Med.* 2017; 47: 769-780.
  99. Katzmarzyk PT, Barreira TV, Broyles ST, Champagne CM, Chaput JP, Fogelholm M, et al. Physical Activity, Sedentary Time, and Obesity in an International Sample of Children. *Med Sci Sports Exerc.* 2015; 47: 2062-2069.
  100. De Bourdeaudhuij I, Verloigne M, Maes, Van Lippevelde W, Chinapaw MJ, Te Velde SJ, et al. Associations of physical activity and sedentary time with weight and weight status among 10- to 12-year-old boys and girls in Europe: A cluster analysis within the energy project. *Pediatr Obes.* 2013; 8: 367-75.
  101. Qiao Y, Zhang T, Liu H, Katzmarzyk PT, Katzmarzyk PT, Chaput JP, Fogelholm M, et al. Joint Association of Birth Weight and Physical Activity/Sedentary Behavior with Obesity in Children Ages 9-11 Years from 12 Countries. *Obesity (Silver Spring).* 2017; 25: 1091-1097.
  102. Regnier SM, Sargis RM. Adipocytes under assault: environmental disruption of adipose physiology. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842: 520-533.
  103. Legler J, Fletcher T, Govarts E, Porta M, Blumberg B, Heindel JJ, et al. Obesity, diabetes and associated costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100: 1278-1288.
  104. Vafeiadi M, Georgiou V, Chalkiadaki G, Rantakokko P, Kiviranta H, Karachaliou M, et al. Association of prenatal exposure to persistent organic pollutants with obesity and cardiometabolic traits in early childhood: the Rhea mother-child cohort (Crete, Greece). *Environ Health Perspect.* 2015; 123: 1015-1021.
  105. Karlsen M, Grandjean P, Weihe P, Steuerwald U, Oulhote Y, Valvi D, et al. Early-Life Exposures to Persistent Organic Pollutants in Relation to Overweight in Preschool Children. *Reprod Toxicol.* 2016; 68: 145-153.
  106. Tang-Péronard JL, Heitmann BL, Jensen TK, Vinggaard AM, Madsbad S, Steuerwald U, et al. Prenatal exposure to persistent organochlorine pollutants is associated with high insulin levels in 5-year-old girls. *Environ Res.* 2015; 142: 407-413.
  107. Agay-Shay K, Martinez D, Valvi D, Garcia-Esteban R, Basagaña X, Robinson O, et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals during pregnancy and weight at 7 years of age: a multi-pollutant approach. *Environ Health Perspect.* 2015; 123: 1030-1037.
  108. Heggeseth B, Harley K, Warner M, Jewell N, Eskenazi B. Detecting Associations between Early-Life DDT Exposures and Childhood Growth Patterns: A Novel Statistical Approach. *PLoS One.* 2015; 10: e0131443.
  109. Hoepner LA, Whyatt RM, Widen EM, Hassoun A, Oberfield SE, Mueller NT, et al. Bisphenol A and adiposity in an inner-city birth cohort. *Environ Health Perspect.* 2016; 124: 1644-1650.
  110. Vafeiadi M, Roumeliotaki T, Myridakis A, Chalkiadaki G, Fthenou E, Dermitzaki E, et al. Association of early life exposure to bisphenol A with obesity and cardiometabolic traits in childhood. *Environ Res.* 2016; 146: 379-387.

111. Menale C, Grandone A, Nicolucci C, Cirillo G, Crispi S, di Sessa A, et al. Bisphenol A is associated with insulin resistance and modulates adiponectin and resistin gene expression in obese children. *Pediatr Obes*. 2016; 17.
112. Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med*. 2005; 26: 235–244.
113. Fan Y, Zhang C, Bu J. Relationship between Selected Serum Metallic Elements and Obesity in Children and Adolescent in the U.S. *Nutrients*. 2017; 9: 104.
114. Del Razo LM, García-Vargas GG, Valenzuela OL, Castellanos EH, Sánchez-Peña LC, Currier JM, et al. Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environ Health*. 2011; 10: 1-11.
115. Ceja-Galicia ZA, Daniel A, Salazar AM, Pánico P, Ostrosky-Wegman P, Díaz-Villaseñor A. Effects of arsenic on adipocyte metabolism: Is arsenic an obesogen? *Mol Cell Endocrinol*. 2017; 452: 25-32.
116. Vangipuram, SD, Sheele J, Atkinson RL, Holland TC, Dhurandhar NV. A human adenovirus enhances preadipocyte differentiation. *Obesity Res*. 2004; 12: 770-777.
117. Rogers PM1, Fusinski KA, Rathod MA, Loiler SA, Pasarica M, Shaw MK, et al. Human adenovirus Ad-36 induces adipogenesis via its E4 orf-1 gene. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32: 397-406.
118. Rathod M, Rogers P, Vangipuram, McAllister E, Dhurandhar N. Adipogenic Cascade can be Induced without Adipogenic Media by a Human Adenovirus. *Obesity (Silver Spring)*. 2009; 17: 657-664.
119. McMurphy TB, Huang W, Xiao R, Liu X, Dhurandhar NV, Cao L. Hepatic Expression of Adenovirus 36 E4ORF1 Improves Glycemic Control and Promotes Glucose Metabolism Through AKT Activation. *Diabetes*. 2017; 66: 358-371.
120. Cakmakliogullari EK, Sanlidag T, Ersoy B, Akcali S, Var A, Cicek C. Are human adenovirus-5 and 36 associated with obesity in children? *J Investig Med*. 2014;62: 821-824.
121. DuĀĵĀĵtkovĀĵĀ, L, ZamrazilovĀĵĀ, H, Aldhoon HainerovĀĵĀ, I, Atkinson RL, SedĀĵĀĵkovĀĵĀ, B, Lee ZP, et al. Association of adenovirus 36 infection with obesity-related gene variants in adolescents. *Physiol Res*. 2015; 64 Suppl 2: S197-202.
122. Karamese M, Altoparlak U, Turgut A, Aydogdu S, Karamese SA. The relationship between adenovirus-36 seropositivity, obesity and metabolic profile in Turkish children and adults. *Epidemiol Infect*. 2015; 143: 3550-3556.
123. Vander Wal JS, Huelsing J, Dubuisson O, Dhurandhar NV. An observational study of the association between adenovirus 36 antibody status and weight loss among youth. *Obes Facts*. 2013; 6: 269-278.
124. Na HN, Hong YM, Ye MB, Park S, Kim IB, Nam JH. Adenovirus 36 Attenuates Weight Loss from Exercise but Improves Glycemic Control by Increasing Mitochondrial Activity in the Liver. *PLoS ONE*. 2014; 9: e114534.
125. Trovato GM, Martines GF, Garozzo A, Tonzuso A, Timpanaro R, Pirri C, et al. Ad36 adipogenic adenovirus in human non-alcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2010; 30: 184-190.
126. Vangipuram SD, Yu M, Tian J, Stanhope KL, Pasarica M, Havel PJ, et al. Adipogenic human adenovirus-36 reduces leptin expression and secretion and increases glucose uptake by fat cells. *Int J Obes (Lond)*. 2007; 31: 87-96.
127. Na HN, Nam JH. Adenovirus 36 as an obesity agent maintains the obesity state by increasing MCP-1 and inducing inflammation. *J Infect Dis*. 2012; 205: 914-922.
128. Berger PK, Pollock NK, Laing EM, Warden SJ, Hill Gallant KM, Hausman DB, et al. Association of adenovirus 36 infection with adiposity and inflammatory-related markers in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99: 3240-3246.
129. Kocazeybek B, Dinc HO, Ergin S, Saribas S, Ozcabi BT, Cizmecigil U, et al. Evaluation of Adenovirus-36 (Ad-36) antibody seropositivity and adipokine levels in obese children. *Microb Pathog*. 2017; 108: 27-31.
130. Yamada T., Hara K., Kadowaki T. Association of adenovirus 36 infection with obesity and metabolic markers in humans: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2012; 7: e42031.
131. Shang Q, Wang H, Song Y, Wei L, Lavebratt C, Zhang F, et al. Serological data analyses show that adenovirus 36 infection is associated with obesity: a metaanalysis involving 5739 subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2014; 22: 895-900.
132. Xu MY, Cao B, Wang DF, Guo JH, Chen KL, Shi M, et al. Human adenovirus 36 infection increased the risk of obesity: a meta-Analysis update. *Medicine (Baltimore)*. 2015; 94: e2357.
133. Lin WY, Dubuisson O, Rubicz R, Liu N, Allison D, Curran J, et al. Long-term changes in adiposity and glycemic control are associated with past adenovirus infection. *Diabetes Care*. 2013; 36: 701–707.
134. Park S, Kim J, Shin HJ, Hong YM, Sheen YH, Park HL, et al. Tracking Study About Adenovirus 36 Infection: Increase of Adiposity. *J Microbiol Biotechnol*. 2015; 25: 2169-2172.
135. Sabin MA, Burgner D, Atkinson RL, Pei-Lun Lee Z, Magnussen CG, Cheung M, et al. Longitudinal investigation of adenovirus 36 seropositivity and human obesity: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Int J Obes (Lond)*. 2015; 39: 1644-1650.
136. Wen L, Duffy A. Factors Influencing the Gut Microbiota, Inflammation, and Type 2 Diabetes. *J Nutr*. 2017; 147: 1468S-1475S.
137. Hamilton MK, Raybould HE. Bugs, guts and brains, and the regulation of food intake and body weight. *Int J Obes Suppl*. 2016; 6: S8-S14.
138. Chiriac MT, Mahapatro M, Neurath MF, Becker C. The Microbiome in Visceral Medicine: Inflammatory Bowel Disease, Obesity and Beyond. *Visc Med*. 2017; 33: 153-162.
139. Araújo JR, Tomas J, Brenner C, Sansonetti PJ. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie*. 2017; (17): 30143-30148.
140. Dahiya DK, Renuka, Puniya M, Shandilya UK, Dhewa T, Kumar N, et al. Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review. *Front Microbiol*. 2017; 8: 563.
141. Bhattacharjee S, Kalbfuss N, Prazeres da Costa C. Parasites, microbiota and metabolic disease. *Parasite Immunol*. 2017; 39.

# *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 y 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 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, México.  
Email: rebecapms@ujed.mx

## Abstract

**Background and purpose:** Smoking is a major public health problem worldwide. Polymorphisms in *CHRNA3*, *CHRNA5*, and *CHRNB4* 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.

## KEYWORDS

*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 *CHRNA4* 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 (Improgo, 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 GENEPOP 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

	Smokers ( <i>n</i> = 192)	Never smokers ( <i>n</i> = 120)	<i>P</i> -value
Age			
Median (min-max)	43 (16–97)	48 (16–84)	0.18 <sup>a</sup>
Gender <i>n</i> (%)			
Men	129 (67)	52 (43)	0.01 <sup>b</sup>
Women	63 (33)	68 (57)	
Pack-year index			
Median (min-max)	3.8 (0.05–103)	N/A	
Smoking status <i>n</i> (%)			
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

Polymorphism	All individuals <i>n</i> = 312	Smokers <i>n</i> = 192	Never smokers <i>n</i> = 120	$\chi^2$ ( <i>P</i> -value)
<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

	Light <i>n</i> = 110	Moderate <i>n</i> = 52	Heavy <i>n</i> = 30	<i>P</i> -value
Age				
Median (Min–Max)	30 (16–97)	49 (17–81)	57 (22–75)	0.01 <sup>a</sup>
Gender <i>n</i> (%)				
Men	64 (58)	42 (81)	23 (77)	0.01 <sup>b</sup>
Women	46 (42)	10 (19)	7 (23)	
Pack-year index				
Median (Min–Max)	1.45 (0.05–30)	14.1 (0.3–50)	34.5 (10–92)	0.001 <sup>a</sup>
Cigarettes per day				
Median (Min–Max)	3 (1–5)	10 (6–19)	20 (20–40)	0.0001 <sup>a</sup>
Fagerström Test of Nicotine Dependence				
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 <i>n</i> (%)	Heavy smokers <i>n</i> (%)	OR (CI 95%)	<i>P</i> -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>b</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>a</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 <i>n</i> = 192	Lung cancer patients <i>n</i> = 74	COPD patients <i>n</i> = 117	<i>P</i> -value
Age				
Median (Min–Max)	43 (16–97)	61 (23–84)	68 (37–88)	<b>0.01<sup>a</sup></b>
Sex <i>n</i> (%)				
Women	63 (33)	15 (20)	44 (38)	<b>0.02<sup>2</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 <i>n</i> (%)				
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>Kruskal-Wallis test.<sup>b</sup> $\chi^2$ -test.

Highlighted in bold significant values.

Legend: NA: not applied.

Caucasian, 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/CHRNA4* 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/CHRNA4* 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 <i>n</i> = 192	Lung cancer patients <i>n</i> = 74	OR (CI 95%)	<i>P</i> -value	COPD patients <i>n</i> = 117	OR (CI 95%)	<i>P</i> -value
<b><i>CHRNA3</i> rs1051730</b>	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)			<i>n</i> (%)		
Codominant							
GG	138 (72)	45 (61)	1		69 (59)	<b>1</b>	
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>
<b><i>CHRNA5</i> rs16969968</b>	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)			<i>n</i> (%)		
Codominant							
GG	136 (71)	45 (60)	1		69 (59)	<b>1</b>	
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	<i>P</i> -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, Summah, 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-Esquivel, A., Padilla-Rivas, R., Cázares-Samaniego, P., Posadas-Valay, R., & Velasco-Castañón, 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>.

- Doyle, G. A., Wang, M. J., Chou, A. D., Oleynick, J. U., Arnold, S. E., & Buono, R. J. (2011). *In vitro* and *ex vivo* analysis of CHRNA3 and CHRNA5 haplotype expression. *PLoS ONE*, *6*(8), e23373. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023373>.
- Fowler, C. D., Tuesta, L., & Kenny, P. J. (2013). Role of  $\alpha 5^*$  nicotinic acetylcholine receptors in the effects of acute and chronic nicotine treatment on brain reward function in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, *229*(3), 503–513. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3235-1>.
- Georgiadis, P., Hebels, D. G., Valavanis, I., Liampa, I., Bergdahl, I. A., & Johansson, A. (2016). Omics for prediction of environmental health effects: Blood leukocyte-based cross-omic profiling reliably predicts diseases associated with tobacco smoking. *Scientific Reports (Nature)*, *3*(6), 20544. <https://doi.org/10.1038/srep20544>.
- Halldén, S., Sjögren, M., Hedblad, B., Engström, G., Hamrefors, V., Manjer, J., & Melander, O. (2016). Gene variance in the nicotinic receptor cluster (CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4) predicts death from cardiopulmonary disease and cancer in smokers. *Journal of Internal Medicine*, *279*, 388–398. <https://doi.org/10.1111/joim.12454>.
- Hayes, R., & Borrelli, B. (2013). Differences between Latino daily light and heavier smokers in smoking attitudes, risk perceptions, and smoking cessation outcome. *Nicotine & Tobacco Research*, *15*(1), 103–111. <https://doi.org/10.1093/ntr/nts095>.
- Hung, R., McKay, J. D., Gaborieau, V., Boffetta, P., Hashibe, M., & Zaridze, D. (2008). A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature*, *452*(3), 633–637. <https://doi.org/10.1038/nature06885>.
- Improgo, M. R., Soll, L. G., Tapper, A., & Gardner, P. (2013). Nicotinic acetylcholine receptors mediate lung cancer growth. *Frontiers in Physiology: Membrane Physiology and Membrane Biophysics*, *4*, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00251>.
- Jha, P., Phil, D., & Peto, R. (2014). Global effects of smoking, of quitting and of taxing tobacco. *New England Journal of Medicine*, *370*, 60–68. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1308383>.
- Kaur-Knudsen, D., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E. (2012). CHRNA3 genotype, nicotine dependence, lung function and disease in the general population. *European Respiratory Journal*, *40*(6), 1538–1544. <https://doi.org/10.1183/09031936.00176811>.
- Lambrechts, D., Buyschaert, I., Zanen, P., Coolen, J., Lays, N., & Cuppens, H. (2010). The 15q24/25 susceptibility variant for lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease is associated with emphysema. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, *181*, 486–493. <https://doi.org/10.1164/rccm.200909-1364OC>.
- Le Marchand, L., Derby, K. S., Murphy, S. E., Hecht, S. S., Hatsukami, D., & Carmella, S. G. (2008). Smokers with the CHRNA lung cancer-associated variants are posed to higher levels of nicotine equivalents and a carcinogenic tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Research*, *68*(22), 9137–9140. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2271>.
- Loukola, A., Hällfors, J., Korhonen, T., & Kaprio, J. (2014). Genetics and smoking. *Current Addiction Reports*, *1*, 75–82. <https://doi.org/10.1007/s40429-013-0006-3>.
- Lutz, S., & Hokanson, J. (2014). Genetic influences on smoking and clinical disease understanding behavioral and biological pathways with mediation analysis. *Annals American Thoracic Society*, *11*(7), 1082–1083. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201407-315ED>.
- NSA: National Survey of Addictions. (2011). Drug Report. National Institute of Psychiatry Ramón de la Fuente Muñiz (INPRFM) / Ministry of Health. Retrieved from <https://www.insp.mx/produccion-editorial/novedades-editoriales/2968-encuesta-nacional-de-adicciones-2011-tabaco.html>
- Olfson, E., Saccone, N. L., Johnson, E. O., Chen, L-S., Culverhouse, R., & Doheny, K. (2015). Rare, low frequency and common coding variants in CHRNA5 and their contribution to nicotine dependence in European and African Americans. *Molecular Psychiatry*, *21*601–607. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.105>.
- Oni, E. N., Halikere, A., Li, G., Toro-Ramos, A. J., Swerdel, M. R., & Verpeut, J. L. (2016). Increased nicotine response in iPSC-derived human neurons carrying the CHRNA5 N398 allele. *Scientific Reports (Nature)*, *4*(6), 34341. <https://doi.org/10.1038/srep34341>.
- Pierce, J., White, V., & Emery, S. (2012). What public health strategies are needed to reduce smoking initiation? *Tobacco Control*, *21*, 258–264. <https://doi.org/10.1136/tobaccocontrol-2011-050359>.
- Rabe, K. F., & Watz (2017). Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*, *13*(389), 1931–1940. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31222-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31222-9).
- Ross, K., Gubner, N., Tyndale, R., Hawk, L. W., Lerman, C., & George, T. P. (2016). Racial differences in the relationship between rate of nicotine metabolism and nicotine intake from cigarette smoking. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *148*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.05.002>.
- Saccone, N., Wang, J. C., Breslau, N., Johnson, E. O., Hatsukami, D., & Saccone, S. F. (2009). The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research*, *69*(17), 6848–6856. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0786>.
- Sakuma, K., Felicitas, J., Fagan, P., Gruder, C., Blanco, L., Cappelli, C., & Trinidad, D. (2015). Smoking trends and disparities among black and non-Hispanic whites in California. *Nicotine & Tobacco Research*, *17*(12), 1491–1498. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntv032>.
- Sakuma, K., Felicitas-Perkins, J. Q., Blanco, L., Fagan, P., Pérez-Stable, E. J., & Pulvers, K. (2016). Tobacco use disparities by racial/ethnic groups: California compared to the United States. *Preventive Medicine*, *91*, 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2016.08.035>.
- Shiraishi, K., Kohno, T., Kunitoh, H., Watanabe, S., Goto, K., & Nishiwaki, Y. (2009). Contribution of nicotine acetylcholine receptor polymorphisms to lung cancer risk in a smoking-independent manner in the Japanese. *Carcinogenesis*, *30*(1), 65–70. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn257>.
- Spitz, M. R., Amos, C. I., Dong, Q., Lin, J., & Wu, X. (2008). The CHRNA5-A3 region on chromosome 15q24-25.1 is a risk factor both for nicotine dependence and for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *100*(21), 1552–1556. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn363>.
- Sun, H., Pan, Y., He, B., Deng, Q., Ying, H., Chen, J., ... Wang, S. (2016). Different effects of the three polymorphisms on 15q25.1 on lung cancer risk: Evidence from published



- literatures. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 12(1), 12–19. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.151863>.
- Thorgeirsson, T. E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., & Magnusson, K. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*, 452, 3. <https://doi.org/10.1038/nature06846>.
- Willis, D., Popovech, M., Gany, F., Hoffman, C., Blum, J., & Zelikoff, J. (2014). Toxicity of gutkha, a smokeless tobacco product gone global: Is there more to the toxicity than nicotine? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 919–933. <https://doi.org/10.3390/ijerph110100919>.
- Xu, Z., Wang, W., Dong, Z., Li, T., Cao, C., & Jin, J. (2015). *CHRNA5* rs16969968 polymorphism association with risk of lung cancer - evidence from 17,962 lung cancer cases and 77,216 control subjects. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 6685–6690. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.15.6685>.
- Zhang, J., Summah, H., Zhu, Y., & Ming, J. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor variants associated with susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease: A meta-analysis. *Respiratory Research*, 12, 158.
- Zhao, Z., Peng, F., Zhou, Y., Hu, G., He, H., & He, F. (2015). Exon sequencing identifies a novel *CHRNA3-CHRNA5-CHRNA4* variant that increases the risk for chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*, 20, 790–798. <https://doi.org/10.1111/resp.12539>.
- Zhou, H., Yang, J., Li, D., Xiao, J., Wang, B., & Wang, L. (2012). Association of *IREB2* and *CHRNA3/5* polymorphisms with COPD and COPD-related phenotypes in a Chinese Han population. *Journal of Human Genetics*, 57, 738–746. <https://doi.org/10.1038/jhg.2012.104>.

**How to cite this article:** Pérez-Morales R, González-Zamora A, González-Delgado MF, et al. *CHRNA3* rs1051730 and *CHRNA5* rs16969968 polymorphisms are associated with heavy smoking, lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease in a Mexican population. *Ann Hum Genet.* 2018;1–10. <https://doi.org/10.1111/ahg.12264>



# Associations between sperm quality, DNA damage, and CYP1A1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms with 1-hydroxypyrene urinary levels in men occupationally exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons

Rogelio Recio-Vega<sup>1</sup> · Edgar Olivas-Calderon<sup>1,2</sup> · Gladis Michel-Ramirez<sup>1</sup> · Rebeca Isabel Martinez-Salinas<sup>3</sup> · Martha Patricia Gallegos-Arreola<sup>4</sup> · Guadalupe Leticia Ocampo-Gomez<sup>1</sup> · Rebeca Perez-Morales<sup>2</sup>

Received: 2 August 2017 / Accepted: 22 May 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

**Purpose** During recent decades, several reports have suggested a decrease in semen quality and DNA damage due in part to environmental toxicants and industrial chemicals. Among these xenobiotics, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are of particular concern because of their remarkable mutagenic and carcinogenic properties and because several experimental and epidemiological studies have reported adverse effects of PAHs on male reproductive health and DNA structure. The aim of the study was to evaluate the association between 1-hydroxypyrene (1-OHP) urinary levels and sperm quality, DNA damage and the frequency of CYP1A1, GSTT1, and GSTM1 polymorphisms.

**Methods** Semen, urine and blood samples were taken for sperm-quality assessment, 1-OHP urinary level measurement, DNA damage evaluation and polymorphism frequency analysis of three genes implicated in PAH metabolism in a total of 70 Mexican subjects exposed and nonexposed to PAHs.

**Results** A significant decrease in sperm quality and increased DNA damage were registered in occupationally exposed volunteers. Polymorphisms modified the 1-OHP urinary levels; however, no associations were found between them. Inverse associations were registered between the sperm concentration/mL and 1-OHP levels and between tail lengths and the GSTM1 null genotype.

**Conclusions** Our data showed an inverse association between 1-OHP urinary levels and both sperm quality and the DNA integrity. Additionally, the heterozygote variants of CYP1A1-m1 and CYP1A1-m2 significantly increased the urinary excretion of 1-OHP, and the GSTM1 null variant was inversely associated with the comet parameters evaluated.

**Keywords** 1-Hydroxypyrene · DNA damage · Sperm quality · CYP1A1 · GSTT1 · GSTM1

✉ Rogelio Recio-Vega  
rrecio@yahoo.com

✉ Edgar Olivas-Calderon  
eholivas27@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Environmental Health, Biomedical Research Center, Faculty of Medicine, School of Medicine, University of Coahuila, Av. Morelos 900 Ote., CP 27000 Torreón, Coahuila, Mexico

<sup>2</sup> School of Chemical Sciences, University Juarez of Durango State, Av. Artículo 123 s/n Frac. Filadelfia, CP 35010 Gomez Palacio, Durango, Mexico

<sup>3</sup> School of Environmental Engineering, University of Sciences and Arts of Chiapas, Chiapas, Mexico

<sup>4</sup> Department of Genetics and Molecular Biology, Biomedical Research Center of Occident, Guadalajara, Jalisco, Mexico

## Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are composed of two or more combined benzene rings. These compounds form naturally or through the incomplete combustion of organic matter. Associations between exposure biomarkers and air pollution have been described in several recent reviews, and the urinary concentrations of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons as indicators of exposure and metabolism have been specifically considered to be of utility (IARC 2015). The level of 1-hydroxypyrene (1-OHP) in urine has been accepted as a biomarker for recent exposure to PAHs.

It has been reported that exposure to PAHs in the general environment and at work may contribute to sperm dysfunction and to higher rates of DNA denaturation (Hsu et al. 2006). Indeed, several experimental and epidemiological studies have reported the adverse effects of PAHs on male reproductive health, including decreasing sperm quality. Xia et al. (2009) reported that men exposed to PAHs and who had higher 1-OHP urine levels were more likely to have a below-reference sperm concentration and sperm number per mL. Additionally, DNA damage has been reported after exposure to PAHs. Hsu et al. (2006) showed a positive correlation between urinary 1-OHP and both sperm DNA denaturation and with abnormal sperm morphology. Similarly, Moretti et al. (2007) reported an association between 1-OHP levels and both primary DNA damage and an increased genotoxic risk (OR 2.59) in electrode workers compared to reference subjects.

It has been recognized that the altered metabolism of xenobiotics could be very important for the development of diseases or could lead to a decrease in normal function and/or clinical laboratory parameters. The PAH metabolism pathway involves phase I drug metabolism enzymes (cytochrome P450, CYP) and phase II enzymes (especially glutathione *S*-transferases, GSTs). 1-OHP is formed in reactions catalyzed by CYPs, among which CYP1A1 exhibits the highest pyrene hydroxylation activity (Kim et al. 2004) and GSTs catalyze the conjugation of PAHs or their reactive metabolites to GSH, thereby making them readily excretable. These genes are polymorphic, and genetic polymorphisms in these enzymes have been associated with abnormal PAHs metabolism; among them, the most studied polymorphisms are CYP1A1-m1, CYP1A1-m2, GSTT1 and GSTM1. Petchpoung et al. (2011) evaluated the association between the 1-OHP concentration and CYP1A1 and GST genetic polymorphisms in Thai bus drivers and showed that high 1-OHP concentrations were associated with CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms. Chatterjee et al. (2009) reported that carrying the GSTM1 null genotype is associated with an increased risk of oral cancer and that both the m1 and m2 polymorphisms in CYP1A1 were associated with oral pathologies as well.

Most published studies have separately evaluated the previously mentioned association; therefore, the aim of this work was to evaluate the joint the polymorphism of three genes implicated in PAH metabolism, including CYP1A1-m1, CYP1A1-m2, GSTM1 and GSTT1, as well as the chronic effects of these chemical compounds on male reproductive health and DNA structure in subjects occupationally and nonoccupationally exposed to PAHs.

## Materials and methods

### Study population

Subjects were recruited by personal interviews and by the distribution of flyers. More than 130 men were evaluated; however, only 95 men fulfilled the inclusion criteria, and only 70 provided biological samples. The participants were men aged 18–60 years (mean 29.6 years) and were permanent residents from two suburban communities that form part of the geographic area known as Comarca Lagunera, which is located in the north-central part of Mexico. The selected nonoccupational exposed subjects were healthy officer workers and permanent residents from selected communities (Group 1;  $n = 35$ ); meanwhile, the exposed subjects (Group 2;  $n = 35$ ) were brick factory workers with a continuous labor history of at least 5 years (average 9.8 years). The brick kiln workers worked 8–10 h per day, and no protective equipment was used during the work day; additionally, almost all the workers are exposed to direct sunlight for 8–10 h a day. Brick manufacturing involves three main steps: molding, drying and firing baking. The brick kiln workers were involved in carrying the clay dust and bricks, molding or baking. According to their respective activities, they were classified as green brick kiln workers (molding and stacking/carrying) and red brick kiln workers (loading/carrying and baking). This job classification can result in widely different exposure. Any clay-added compounds were mixed with the clays used for the manufacture of bricks. Wood, coal and scrap car tires were used as fuel for baking the bricks.

All subjects included did not have a history of chemotherapy, radiotherapy or chronic diseases.

At the end of the study, subjects received written and oral information about their results to emphasize the importance of continuing education for exposed workers to minimize the effects of occupational exposure and the risk of male illness associated with work.

### Questionnaire application

Information was collected through face-to-face interviews and included socio-demographic variables; socioeconomic status; residential history; lifestyle factors such as smoking, alcohol intake, exercise, history of diseases, occupational history, indoor stove and/or fireplace use, wood burning, and synthetic log burning; diet (grilled/barbecued and smoked meats, smoked beef, pork, lamb and grilled/barbecued beef, pork and lamb); and vehicular traffic. Smoking frequency was defined as the number of cigarettes smoked per day and smoking history as the number of years smoking.

All participants agreed to donate blood, semen and urine samples at the end of their work week. Written informed consent was obtained from each participant at the time of the interview. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine from the University of Coahuila and the study was conducted in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards.

### Blood sample collection

Blood samples (10 mL) were collected from the antecubital vein into 10-mL vacuum blood collection polypropylene tubes (Vacutainer®) with and without anticoagulant. The serum was separated by centrifugation at 3000×g for 10 min, transferred to new tubes and stored at – 70 °C until analysis. White cells were obtained from whole blood for the comet assay and DNA genotyping.

### Semen analysis

All participants were instructed to abstain from sexual activity for at least 3 days before providing the semen sample (mean 3.6 days). The semen samples were collected in sterile plastic containers and allowed to liquefy for 30 min; thereafter, the samples were analyzed by direct microscopy according to the World Health Organization (WHO) criteria (2010). The proposed WHO semen ranges were used as reference values.

### Urine collection and 1-OHP analysis

A spot urine sample was collected from each participant at the end of the labor week and frozen (– 70 °C) until analysis. 1-OHP urinary levels were measured at the Department of Environmental Toxicology, Faculty of Medicine, University of San Luis Potosi, Mexico. 1-OHP was quantified following the method described by Kuusimäki et al. (2004). The analyses were performed by HPLC (HP1100; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a fluorescence detector (G1321A). The precolumn was a Zorbax SB-C18 and the column was a Zorbax Eclipse XDB-C18. The column temperature was set to 40 °C, the flow was adjusted to 1 mL/min, and the injection volume was 20 µL. The eluent was 88:12 methanol/water and 1% ascorbic acid. Data were collected and processed using the HP ChemStation software (Santa Clara, CA; USA). Urinary 1-OHP concentrations were adjusted to urinary creatinine. Urinary creatinine was determined using colorimetric commercial kits (Creatinine-J, Spinreact®; Girona; Spain). The lower detection quantification limits for 1-OHP and creatinine were 0.01 and 0.3 nmol/L, respectively. Control quality was certified

using standards from the IRIS Clin Cal Recipe (Munich; Germany). The intra- and external-quality control were < 10 and < 15%, respectively, and the percentage of recovery was > 98%.

### CYP1A1, GST1 and GSTM1 polymorphisms

DNA was isolated using standard methods (Blin and Stafford 1976) from peripheral blood samples, which were collected into EDTA vacutainer tubes, and extraction of genomic DNA material was performed with DNAzol according to the manufacturer's instructions (DNAzol® BD, Cincinnati, OH, USA). For detection of the SNPs, *CYP1A1-MspI* (*m1*) (rs4646903) and *CYP1A1-Ile/Val* (*m2*) (rs1048943) TaqMan® probes (Applied Biosystems, CA, USA) were used following the supplier's instructions. Briefly, 10 µL of TaqMan® Genotyping Mix and 0.5 µL of trials, which included the two primers and a fluorescent probe specific for each of the polymorphisms, were added to a capped PCR tube with optical quality. Two microliters was further added to the solution containing the DNA probe (~ 10 to 20 ng) and brought to a final volume of 20 µL by adding molecular grade water (all reagents from Applied Biosystems, CA, USA).

The CYP1A1 genotypes at the *m1* and *m2* variants were analyzed by PCR-based restriction fragment length polymorphism (RFLP) as previously described (Cascorbi et al. 1996; Hayashi et al. 1991). The primer for the *m1* site was MIF 5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3', which produces a 340-bp fragment and the primer for *m2* was 5'-TTC CAC CCG TTG CAG CAG GAT AGC C-3', which generates a 204-bp fragment. The PCR thermocycler conditions were as follows: 94 °C for 4 min; 35 cycles of 94 °C for 1 min, 63 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C (7 min). The amplified products were digested with the Bsa I restriction enzyme (Promega, Wisconsin; USA) at 50 °C for 12 h. Allele discrimination was performed using 8% polyacrylamide gel (19:1) electrophoresis followed by silver staining (Sanguinetti et al. 1994). The absence of a band indicates deletion of the gene, and the presence of the band indicates a normal allele.

The GSST1 and GSTM1 genotypes were analyzed by PCR-based restriction fragment length polymorphism as previously described (Cascorbi et al. 1996; Hayashi et al. 1991). For the GSST1 genotypes (wild type/null), we used the 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' and 5'-TCA CCGGATCATGGCCAGCA-3' primers and for GSTM1 (wild type/null) we used the 5'-CTGCCCTACTTGATT GATGGG-3' and 5'-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3' primers. These primers amplify the gene producing 480 and 271 bp segments, respectively. The PCR conditions consisted of an initial melting temperature of 94 °C (4 min), followed by 35 cycles of melting at 94 °C for 2 min, annealing

at 59 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1 min. The DNA samples also amplified a 312-bp segment of the CYP1A1 gene as an internal control.

The Hardy–Weinberg equilibrium was tested by a goodness-of-fit Chi-square test to compare the observed genotype frequencies to the expected frequencies among control subjects. With the aim of avoiding bias due to ethnicity, only subjects born in the studied geographical areas were included and no familial samples were included.

### DNA damage analysis by single cell gel electrophoresis (comet assay)

An alkaline comet assay was performed according to the method of Singh et al. (1988) and Tice et al. (2000) with minor modifications. Slides were prepared in duplicate per sample. Dust-free plain slides were covered with a layer of 150 µL of 1% normal melting agarose and allowed to dry for 10 min in a hot air oven. This layer served as an anchor for additional layers to prevent slippage. The blood sample (5–10 µL) was mixed with 90 µL of warm 0.5% low melting agarose (LMA), and this mixture was layered as a second additional layer and gelled at 4 °C for 15 min. A third extra layer of 150 µL of 0.5% LMA was added on top and gelled again at 4 °C for 15 min. The slides were treated for 2 h at 4 °C in freshly prepared, chilled lysis buffer solution (25 mM NaCl, 100 mM sodium EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, and 10% DMSO added before use at pH 10). The slides were removed from the lysis solution, incubated in alkaline electrophoresis buffer (10 N NaCl and 200 mM EDTA, pH 13) for 20 min followed by electrophoresis (25 V and 300 mA) for 30 min in the same buffer. The slides were then neutralized with Tris buffer (0.4 M Tris, pH 7.5), rinsed with distilled water and stained with 100 µL ethidium bromide (20 µg/mL) for 5 min under dark conditions.

### Comet scoring

A total of 200 cells from each of the duplicate slides were examined randomly using a Carl Zeiss Axioskop 2 Plus fluorescence microscope. The extent of DNA damage was measured in a total of 10 comet parameters using the comet assay IV software. However, with the aim of comparing our results with the literature, only the three most evaluated parameters were reported (tail length, tail moment and tail migration). The tail moment is defined as the percentage of DNA in the tail multiplied by the length between the center of the head and tail (Olive et al. 1990). A positive control was assessed in each comet assay and its Olive tail moment (OTM) parameter measurement was significantly different ( $p < 0.05$ ) to the concurrent vehicle control.

### Statistical analysis

The independent and dependent variables were described according to their frequency and distribution measurements (arithmetic mean, range and standard deviation). The sexual abstinence period was registered and statistically controlled. Differences in sperm parameters, urinary metabolite levels, DNA damage measurements or genotype determination were established by means of the *t* test, Mann–Whitney test or Chi-square depending on the type of variable. 1-OHP urinary levels were log-transformed before analysis.

Linear regression models were used to assess crude or independent associations between the dependent variables and the 1-OHP urinary levels. Additionally, multivariate regression analysis was used to assess the relationships between semen quality parameters, DNA damage and gene polymorphisms and 1-OHP urinary levels while controlling for confounding factors (body mass index (BMI), schooling, smoking, exposure time, smoking history, GSTT1 and GSTM1). Covariates were selected for the final models based on their significance ( $P$  value  $\leq 0.05$ ). All analyses were performed using the STATA 11.0 statistical software (Stata Corp., College Station, TX, USA).

### Results

Table 1 shows the socio-demographic and anthropometric characteristics and lifestyles of the participants, which were similar among the studied groups, with the exception of schooling and exposure time, which were significantly higher in groups 1 and 2, respectively ( $P < 0.05$ ). 1-OHP urinary levels were 5.1 times higher in group 2 ( $P < 0.05$ ). Among the brick factory workers, the highest 1-OHP urinary levels were found in those involved in brick baking (4.0 µmol/mol creatinine) and the lowest in the officers and in clay dust carriers (0.02 and 0.03 µmol/mol creatinine, respectively). 1-OHP urinary levels were positively associated with group 2 ( $\beta = 0.57$ ; 95% CI 0.29–0.85;  $P < 0.01$ ). In smokers, 1-OHP urinary levels were 2.2 times higher than those registered in nonsmokers; however, this difference was not significantly different ( $P = 0.07$ ).

No significant correlation between DNA damage and sperm quality was found (data not shown).

A significant reduction in all evaluated semen parameters was observed in volunteers from group 2 when compared with the obtained in group 1 (Table 2) (Fig. 1). When sperm parameters were compared between smokers and nonsmokers, no statistically significant difference was found ( $P > 0.2$ ).

The genotype distributions of the polymorphisms were in accordance with Hardy–Weinberg equilibrium. For the overall studied subjects, more than 27, 10, 83 and 90% were wild type for the CYP1A1-m1, CYP1A1-m2, GSTM1 and



**Table 1** Socio-demographic, anthropometric characteristics and life style of participants

	Group 1 (n = 35)	Group 2 (n = 35)
Age (years)	28.82 ± 8.00	30.36 ± 11.0
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.59 ± 4.18	26.39 ± 2.85
Schooling (years)	14.73 ± 1.94	7.54 ± 2.85*
Alcohol intake		
Yes	27 (77.10)	32 (91.43)
No	8 (22.90)	3 (8.57)
Smoking		
Yes	17 (48.57)	18 (51.43)
No	18 (51.43)	17 (48.57)
Cigarettes per day	6.05 ± 4.85	4.22 ± 4.60
Smoking (years)	9.35 ± 5.51	9.36 ± 10.59
Cook with charcoal		
Yes	2 (5.71)	0
No	33 (94.29)	35 (100)
Cook with firewood		
Yes	0	2 (5.71)
No	35 (100)	33 (94.29)
Live close to an industry		
Yes	11 (31.43)	6 (17.14)
No	24 (68.57)	29 (82.86)
Exposure time (years)	0	9.88 ± 9.69*
1-OHP (μmol/mol creatinine)	0.13 ± 0.17	0.67 ± 0.89*

Results are shown as arithmetic mean and standard deviation (percentage)

\* $P < 0.05$  *t* test or Man–Whitney (group 2 vs group 1)

**Table 2** Semen parameters in the studied population

	Group 1 (n = 35)	Group 2 (n = 35)
Volume (mL)	2.91 ± 1.3	2.29 ± 1.2*
Sperm concentration (10 <sup>6</sup> /mL)	61.74 ± 24.2	37.93 ± 24.2*
Total sperm concentration (millions)	173.6 ± 98.6	90.40 ± 79.3*
Total motility (%)	67.25 ± 13.7	54.35 ± 19.7*
Progressive motility (%)	49.03 ± 15.7	35.96 ± 22.1*
Viability (%)	59.67 ± 17.1	50.32 ± 14.7*
Normal morphology (%)	67.25 ± 11.3	50.00 ± 15.0*

Results are shown as arithmetic mean and standard deviation

\* $P < 0.05$  Man–Whitney (group 2 vs group 1)

GSTT1 genes, respectively. When we analyzed the frequencies of the CYP1A1-m1 and CYP1A1-m2 polymorphisms and GSTM1 and GSTT1 wild type/null genotypes between the studied groups, we found no significant differences between the studied groups (data not shown).

When the comet assay results were analyzed, the tail length, tail moment and tail migration were 1.4, 1.9 and 2.0

times higher ( $P < 0.05$ ), respectively, in the occupationally exposed subjects (Table 3) (Fig. 2). No significant differences ( $P > 0.7$ ) were found when the comet parameters were compared between smokers and nonsmokers.

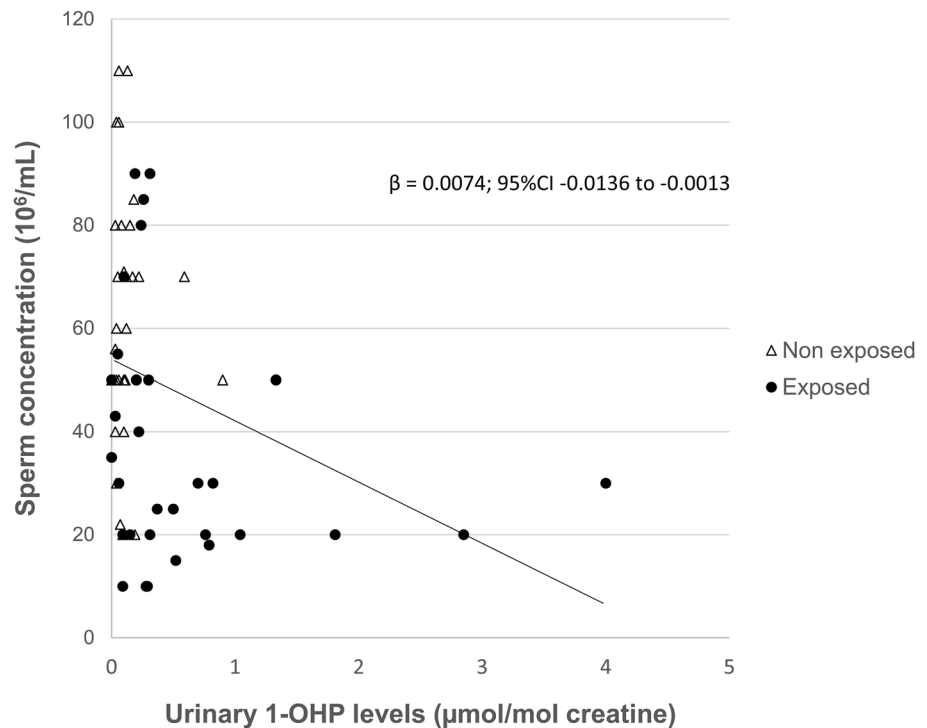
When 1-OHP urinary levels were compared between groups and by CYP1A1-m1 genotype, higher levels ( $P < 0.05$ ) were observed in the wild-type (wt/wt) and heterozygote carriers (wt/vt) from group 2. When 1-OHP levels were compared according to the CYP1A1-m2 genotype, higher 1-OHP urinary levels ( $P < 0.05$ ) were observed in the heterozygote (wt/vt) and mutant (vt/vt) carriers from group 2. Similarly, higher 1-OHP levels ( $P < 0.05$ ) were observed in the wild-type GSTT1 carriers from group 2 (Table 4).

Table 5 shows the crude and adjusted regression data. Several statistical associations obtained in the crude statistical model did not remain in the adjusted model; those which remained included the inverse associations between 1-OHP urinary levels with BMI and schooling. With respect to the sperm parameters, inverse associations were registered between the sperm concentration/mL with 1-OHP urinary levels, total sperm motility with exposure time and viability with smoking history. No significant associations were found between 1-OHP urinary levels with the different genotypes frequencies. When the relationship between the comet parameters with the studied variables was analyzed using the multivariate regression model, inverse associations were found between tail length with schooling and the GSTM1 null genotype; in contrast, the tail moment and tail migration showed an inverse association with schooling (Table 5).

## Discussion

The studied subjects have been chronically exposed to high occupational pollutants generated by the incomplete combustion of organic matter used in brick cooking ovens and this was corroborated by the high 1-OHP urinary levels quantified at the end of the labor week, which were more than 5 times higher than those registered in the nonexposed participants. A wide range of 1-OHP levels was observed in the studied subjects, and this was due to the varied exposure degree, but this range was higher among exposed subjects. The mean 1-OHP levels found in the nonexposed volunteers (0.13 μmol/mol creatinine) are similar to those reported in other studies (Choosong et al. 2014; Klöslová et al. 2016; Oliveira-Galvao et al. 2017); meanwhile, the levels registered in our exposed participants (0.67 μmol/mol creatinine) were higher than those reported by Oliveria-Galvão et al. (2017) (0.108 μmol/mol creatinine). These values are similar to those that have been shown for workers from different industries (0.11–1.26 μmol/mol creatinine) (Klöslová et al. 2016), though lower levels were reported by Wang et al. (2015) in petrochemical workers (1.96 μmol/mol creatinine).

**Fig. 1** Lineal regression between urinary 1-OHP levels ( $\mu\text{mol/mol}$  creatinine) and sperm concentration ( $10^6/\text{mL}$ )



**Table 3** Results of comet assay in white cells by studied groups

	Group 1 ( $n=35$ )	Group 2 ( $n=35$ )
Tail length (microns)	$29.61 \pm 9.0$	$42.07 \pm 10.0^*$
Tail moment (microns)	$4.07 \pm 3.5$	$8.11 \pm 4.8^*$
Tail migration (microns)	$11.37 \pm 8.9$	$23.19 \pm 11.2^*$

Results are shown as arithmetic mean and standard deviation

\* $P < 0.05$  Man–Whitney (group 2 vs group 1)

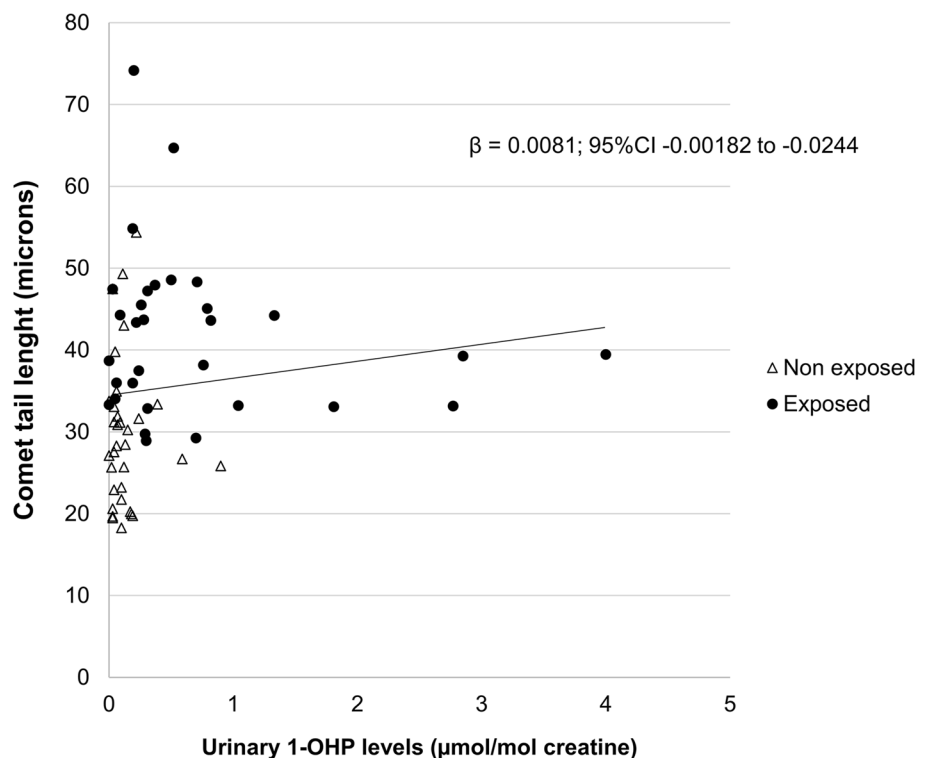
The differences in the 1-OHP urinary levels between our results and those obtained in the performed studies are primarily due to different exposure levels, exposure times, the type of industry, lifestyle, age, sample size and ethnicity.

The relative contribution of PAH sources other than occupational exposure to an individual's exposure is unknown; however, it is known that tobacco smoke is likely the main contributor (Menzie et al. 1992), though diet is the predominant source among nonsmokers (Boström et al. 2002). In our work, no significant differences were found between the studied groups regarding smoking or diet habits; moreover, when the studied population was divided into smokers and nonsmokers, no significant differences were found for the 1-OHP level, sperm and comet parameters. Half of all participants from groups 1 and 2 were smokers; thus, we can assume that part of the 1-OHP levels quantified in our studied population could come from smoking. However, it is also possible the smoking side effects could affect the subjects' health similarly in both groups.

It has been reported that urinary 1-OHP levels and inter-individual differences in the mechanism of PAH-induced disease may be modified and influenced by PAH metabolic gene polymorphisms (Chen et al. 2007). In this work, we evaluated the CYP1A1 (variants m1 and m2) and GSTM1 and GSTT1 (null) polymorphisms and found that the genotyping frequency of CYP1A1-m1, GSTM1 and GSTT1 is similar to that reported in Hispanics (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>), but not compared to that reported in other races. When 1-OHP urinary levels were compared by groups and by genotyping, significant differences were found. When we compared the 1-OHP levels among subjects from the same group by genotyping, significantly high urinary levels ( $P < 0.05$ ) were found in participant carriers of the CYP1A1-m2 wild-type variant when compared with the levels registered in the carriers of the heterozygote variant in group 1. Similar to our results, Chuang and Chang (2007) found significantly higher urinary 1-OHP levels in subjects with the m1/m2 or m2/m2 CYP1A1-m1 genotype, which was also similar to Nie et al. (2009) in subjects with CYP1A1 Val/Val genotype. In contrast, when we compared the 1-OHP urinary levels according to the GST genotyping, no significant differences were found between groups. In contrast to our results, Chuang and Chang (2007) reported significantly higher urinary 1-OHP levels in GSTM1 null carriers, while, Chen et al. (2007) observed this result in GSTT1 null carriers. This difference between our results and the previously mentioned studies may primarily be due to ethnicity and secondly to exposure levels and differences



**Fig. 2** Linear regression between 1-OHP levels ( $\mu\text{mol}/\text{mol}$  creatinine) and comet tail length (microns)



**Table 4** 1-Hydroxypyrene urinary levels by CYP1A1, GSST1 and GSTM1 genotypes and by studied groups

	Group 1 (n = 35)	Group 2 (n = 35)
CYP1A1-m1		
wt/wt	0.10 ± 0.07	1.24 ± 1.7*
wt/vt	0.22 ± 0.00	1.31 ± 0.70*
vt/vt	0.17 ± 0.24	0.54 ± 0.62
CYP1A1-m2		
wt/wt	0.51 ± 0.55	0.29 ± 0.31
wt/vt	0.06 ± 0.05 <sup>&amp;</sup>	0.66 ± 0.85*
vt/vt	0.13 ± 0.13	0.91 ± 1.09*
GSTT1		
Wild type	0.13 ± 0.17	0.71 ± 0.92*
Null	0.2 ± 0.26	0.31 ± 0.07
GSTM1		
Wild type	0.15 ± 0.20	0.71 ± 0.96*
Null	0.10 ± 0.04	0.51 ± 0.24*

Results are shown as arithmetic mean and standard deviation

\* $P < 0.05$  Man–Whitney (group 2 vs group 1)

<sup>&</sup> $P < 0.05$  Man–Whitney (heterozygote variant vs wild type in the same study group)

in the sample size. Our data support previous results and suggest that the evaluated genes play an important role in PAH metabolism independent of the degree of exposure. In our work, the lowest 1-OHP levels were detected in

carriers of heterozygotes, homozygotes and null genetic variants. PAHs' urinary metabolite levels reflect a step in the detoxification process; thus, low urinary excretion of these metabolites in exposed subjects could increase the risk of PAH-related diseases due to the increment in the internal dose. Therefore, the carriers of these genetic variants with low 1-OHP excretion must be followed up by health institutions because these variants could increase the risk for PAH-related diseases.

It is known that PAHs may cause a wide range of DNA damage and genomic instability, and it has been suggested that the DNA damage induced by exposure to PAHs occurs during its metabolism to produce metabolic intermediates such as diol epoxides, which are highly carcinogenic and react with DNA to form DNA strand breaks. Similarly, ROS (e.g., hydroxyl radicals) and reactive redox o-quinones are accountable for causing an autocatalytic oxidation process that is capable of inducing genome fragmentation, which can cause DNA strand breaks, DNA oxidation and the formation DNA adducts (Rodríguez et al. 2012); therefore, the quantity of PAH metabolic intermediates could be directly proportional to the DNA damage. The comet parameters evaluated in our study were statistically higher in the exposed subjects when compared with those obtained in the nonexposed ( $P < 0.05$ ). In the multivariate statistical model, a significant inverse association was found between tail length, tail moment and tail migration with schooling, as well as between tail length with the GSTM1 wild-type

**Table 5** Crude and adjusted linear regression analysis between 1-OHP urinary levels, sperm and comet parameters with socio-demographic variables, life style, exposure history and genetic genotypes

	Crude		Adjusted	
	$\beta$	<i>P</i> value	$\beta$	<i>P</i> value
1-OHP urinary levels				
BMI	- 0.05	0.01	- 0.06	0.044
Schooling	- 0.06	0.000	- 0.06	0.026
Sperm concentration/mL				
1-OHP urinary levels	- 11.97	0.01	- 10.55	0.048
Schooling	1.98	0.018	0.63	0.532
Exposure time	- 0.86	0.037	- 0.61	0.204
Total sperm concentration				
1-OHP urinary levels	- 37.83	0.04	- 24.84	0.207
Schooling	9.06	0.003	6.95	0.072
GSTT1	75.30	0.046	46.57	0.248
Total sperm motility				
Exposure time	- 0.79	0.005	- 0.80	0.019
Progressive sperm motility				
Exposure time	- 0.70	0.031	- 0.56	0.151
Sperm viability				
Smoking history	- 11.49	0.018	- 13.06	0.006
GSTM1	12.69	0.025	6.06	0.396
Sperm morphology				
Schooling	1.25	0.011	0.47	0.456
Exposure time	- 0.75	0.013	- 0.53	0.139
Comet tail length				
Schooling	- 1.33	0.000	- 1.10	0.012
Exposure time	0.37	0.035	0.05	0.779
GSTM1	- 7.93	0.042	- 8.05	0.038
Comet tail moment				
Schooling	- 0.48	0.000	- 0.44	0.019
Comet tail migration				
Schooling	- 1.32	0.000	- 1.22	0.008
GSTM1	- 8.11	0.046	- 7.57	0.062

1-OHP urinary levels and sperm variables were adjusted by BMI, schooling, exposure time, smoking frequency, GSTT1 and GSTM1

Comet variables were adjusted by: schooling, exposure time and GSTM1 polymorphism

carriers. Regarding the association found with schooling, it is important to note that this variable interacts with and could be influenced by other variables such as age, occupation, PAH exposure, social economic status, diet, smoking, alcohol consumption, sunlight exposure, environmental pollution or physical activity among others. Therefore, this association should be considered carefully.

Several experimental and epidemiological studies have reported the adverse effects of PAHs on male reproductive health by decreasing sperm quality. The existing information regarding PAH effects on male reproductive health is still limited and the results are inconsistent. In our work,

almost all the sperm parameters evaluated were significantly different between exposed and nonexposed individuals; however, only sperm count per mL was inversely associated with 1-OHP levels. Meanwhile, total sperm motility was inversely associated with PAH exposure time and sperm viability with smoking history. The lack of an association between the other evaluated sperm parameters and PAH urinary levels is probably due to the wide range of PAH urinary levels registered in the study, which suggests different PAH exposure levels and different xenobiotic metabolism among exposed volunteers, dissimilar susceptibility to sperm DNA damage, a different number of studied subjects per group and different frequencies of polymorphisms in PAH metabolism genes. It has been suggested that PAHs act by acutely disrupting spermatogenesis in its early stages through the induction of sperm bulky DNA-adducts, which has been reported by Jeng et al. (2016). This can negatively affect the germinal epithelium and modify LH, FSH and testosterone serum levels (Jeng and Yu 2008). This disruption can also occur because the developing and maturing sperm are also highly sensitive to lipid peroxidation and DNA damage associated with ROS (Olshan et al. 2010). Additionally, in vivo and in vitro studies have shown that diesel exhaust particles, which contain PAHs, bind to AhR, suppress spermatogenesis, and decrease sperm production in mice (Izawa et al. 2006), and that PAHs can induce cytotoxicity in cultured rat Sertoli cells through apoptosis, which adversely affects spermatogenesis (Raychoudhury and Kubinski 2003). However, these results must be considered carefully because the exposure doses used in both studies are more than 10 times those reported in exposed subjects (Oliveira-Galvao et al. 2017). In contrast, polymorphisms in genes that encode detoxifying enzymes in drug metabolism phase II can modify their expression or function and affect the biotransformation and excretion of toxic compounds to which the male reproductive system is exposed. GSTM1 and GSTT1 encode enzymes that are essential for the detoxification of endogenous and exogenous xenobiotics that facilitate their excretion (Finotti et al. 2009), and their inactivity could attenuate the toxicity of reactive PAH metabolites to Leydig, Sertoli, and germ cells. In our study, using the crude linear regression model, a positive association was observed between total sperm concentration with the GSTT1 wild-type carriers and between sperm viability with the GSTM1 wild-type carriers; however, these associations did not remain in the adjusted model. Similar to our findings, the results obtained by Olshan et al. (2010) did not reveal a consistent pattern between the GSTM1 and GSTZ1 genotypes and an increased occurrence of adverse sperm outcomes. However, the GSTT1 non-null genotype yielded the coefficients with the largest magnitude for sperm count and sperm concentration, suggesting that it might be adverse. In contrast, Finotti et al. (2009) found an association between the GSTM1/T1 (null) frequencies with

decreased sperm count (oligozoospermia) in men with idiopathic infertility. When we analyzed the correlation between DNA damage and sperm quality, no significant correlations were found. Similar to our results, Agarwal and Said (2003) and Sakkas and Alvarez (2010) concluded that the presence of defective spermatozoa containing DNA damage did not affect the sperm count and morphology. Han et al. (2011) stated that DNA damage can occur in the absence of other changes in semen quality and that sperm DNA damage is an objective and independent marker of sperm function. Our study underscored the importance of monitoring sperm DNA integrity as part of an assessment for the impact of occupational and environmental exposure to sperm in brick factory workers. The current research emphasizes the need for a better understanding of the relationship between environmental exposure and semen quality. Additionally, we hope that the current study encourages further research focused on the CYP1A1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and sperm DNA damage to provide new elements regarding the overall male reproductive capacity.

In this study, several important variables were studied. However, it is important to consider that brick kiln workers are exposed to many other environmental contaminants as well as clay dusts, which contain a mixture of inorganic compounds including free silica, iron oxide, lime, magnesium carbonate, alkalis, calcium carbonate, calcium sulfate, and sodium chloride, and to varying amounts of organic materials and gases while burning biomass fuels, which include sulfur dioxide, hydrogen sulfide, carbon dioxide and carbon monoxide and particulate air pollutants (Concha-Barrientos et al. 2006). All of these compounds that were not evaluated in our work could contribute to the health effects observed in this population. Because the system vulnerable to the potential effects of PAH exposure is the male reproductive system, the Secretary of Health should improve public awareness and education about the sources and health effects of PAH exposure.

Further studies with a larger size sample that evaluate PAHs–DNA adducts and controlling risk and genetic factors, as well as measure intermediate metabolic products and other environmental exposure are required to demonstrate how high 1-OHP levels and PAH metabolic gene polymorphisms can contribute to the susceptibility to PAH-induced adverse effect on sperm quality and DNA integrity.

## Conclusion

Our data showed an inverse association between 1-OHP urinary levels and sperm quality and DNA integrity. We also observed that the heterozygote variants of the CYP1A1-m1 and CYP1A1-m2 genes significantly increased the urinary excretion of 1-OHP and that the GSTM1 null polymorphism

was inversely associated with the comet parameters. The subjects were environmentally and occupationally exposed to mid-to-high PAHs levels. Carriers with PAH metabolic gene polymorphisms must be followed up by health institutions because of their increased risk for PAH-related to sperm-quality parameters and DNA fragmentation.

**Acknowledgements** This work was supported by the University of Coahuila, Mexico.

## Compliance with ethical standards

**Ethical standards** The study has been conducted in accordance with the ethical standards established in the Declaration of Helsinki of 1964 and its subsequent amendments or comparable ethical standards.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Agarwal A, Said TM (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9:331–345
- Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 3(9):2303–2308
- Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernstrom B, Johansson C, Kyrklund T et al (2002) Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect* 110(Suppl 3):451–488
- Cascorbi I, Brock Möller J, Roots I (1996) A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 56(21):4965–4969
- Chatterjee S, Chakrabarti S, Sengupta B, Poddar S et al (2009) Prevalence of CYP1A1 and GST polymorphisms in the population of northeastern India and susceptibility of oral cancer. *Oncol Res* 17(9):397–403
- Chen B, Hu Y, Jin T, Lu D, Shao M, Zheng L, Wang Q, Shen Y, Liu H, Liu Y, Zhou Y (2007) The influence of metabolic gene polymorphisms on urinary 1-hydroxypyrene concentrations in Chinese coke oven workers. *Sci Total Environ* 381(1–3):38–46. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.02.021>
- Choosong T, Phakthongsuk P, Tekasakul S, Tekasakul P (2014) Urinary 1-hydroxypyrene levels in workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbon from rubber wood burning. *Saf Health Work* 5(2):86–90. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2014.03.004>
- Chuang CY, Chang CC (2007) Urinary 1-hydroxypyrene level relative to vehicle exhaust exposure mediated by metabolic enzyme polymorphisms. *J Occup Health* 49(2):140–151
- Concha-Barrientos M, Steenland K, Plunnet L (2006) The contribution of occupational risks to global burden of diseases: summary and next steps. *Medlav* 97(2):313–321
- Finotti AC, Costa E, Silva RC, Bordin BM, Silva CT, Moura KK (2009) Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphism in men with idiopathic infertility. *Genet Mol Res* 8(3):1093–1098. <https://doi.org/10.4238/vol8-3gmr642>
- Han X, Zhou N, Cui Z, Ma M, Li L et al (2011) Association between urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and sperm DNA damage: a population study in Chongqing, China.

- Environ Health Perspect 119(5):652–657. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002340>
- Hayashi SI, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K (1991) PCR detection of an A/G polymorphism within exon 7 of the CYP1A1 gene. *Nucleic Acids Res* 19(17):4797
- Hsu PC, Chen IY, Pan CH, Wu KY, Pan MH et al (2006) Sperm DNA damage correlates with polycyclic aromatic hydrocarbons biomarker in coke-oven workers. *Int Arch Occup Environ Health* 79(5):349–356. <https://doi.org/10.1007/s00420-005-0066-3>
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (2015) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Outdoor air pollution 109 France
- Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K, Sagai M (2006) Effects of diesel exhaust particles on the male reproductive system in strains of mice with different aryl hydrocarbon receptor responsiveness. *J Reprod Dev* 53(6):1191–1197
- Jeng HA, Yu L (2008) Alteration of sperm quality and hormone levels by polycyclic aromatic hydrocarbons on airborne particulate particles. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 43(7):675–681. <https://doi.org/10.1080/10934520801959815>
- Jeng HA, Pan CH, Chao MR, Chiu CC, Zhou G, Chou CK, Lin WY (2016) Sperm quality and DNA integrity of coke oven workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Occup Med Environ Health* 29(6):915–926. <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00598>
- Kim YD, Todoroki H, Oyama T, Isse T, Matsumoto A, Yamaguchi T, Kim H, Uchiyama I, Kawamoto T (2004) Identification of cytochrome P450 isoforms involved in 1-hydroxylation of pyrene. *Environ Res* 94(3):262–266
- Klösslová Z, Drímal M, Balog K, Koppová K, Dubajová J (2016) The relations between polycyclic aromatic hydrocarbons exposure and 1-OHP levels as a biomarker of the exposure. *Cent Eur J Public Health* 24(4):302–307. <https://doi.org/10.21101/cejph.a4179>
- Kuusimäki L, Peltonen Y, Mutanen P, Peltonen K et al (2004) Urinary hydroxy-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust. *Int Arch Occup Environ Health* 77(1):23–30. <https://doi.org/10.1007/s00420-003-0477-y>
- Menzie CA, Potocki BB, Santodonato J (1992) Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environ Sci Technol* 26:1278–1284
- Moretti M, Dell’Omo M, Villarini M, Pastorelli R et al (2007) Primary DNA damage and genetic polymorphisms for CYP1A1, EPHX and GSTM1 in workers at a graphite electrode manufacturing plant. *BMC Public Health* 7:270. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-7-270>
- Nie JS, Zhang HM, Sun JY, Zeng P, Zhang L, Niu Q (2009) Relationship between CYP1A1 gene polymorphisms and urinary 1-hydroxypyrene levels in coke oven workers. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* (5):270–275
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiat Res* 122(1):86–94
- Oliveira-Galvão MF, Queiroz JD, Duarte ES, Hoelzemann JJ, André PA, Saldiva PH, Menezes Filho JA, Batistuzzo de Medeiros SR (2017) Characterization of the particulate matter and relationship between buccal micronucleus and urinary 1-hydroxypyrene levels among cashew nut roasting workers. *Environ Pollut (Pt A)*:659–671. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.024>
- Olshan AF, Luben TJ, Hanley NM, Perreault SD, Chan RL, Herring AH, Basta PV, DeMarini DM (2010) Preliminary examination of polymorphisms of GSTM1, GSTT1, and GSTZ1 in relation to semen quality. *Mutat Res* 688(1–2):41–46. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.03.002>
- Petchpoung K, Kaojarern S, Yoovathaworn K, Sura T, Sirivarasai J (2011) The influence of metabolic gene polymorphisms on urinary 1-hydroxypyrene concentration in Thai bus drivers. *Environ Toxicol Pharmacol* 31(1):160–164. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.10.006>
- Raychoudhury SS, Kubinski D (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced cytotoxicity in cultured rat Sertoli cells involves differential apoptotic response. *Environ Health Perspect* 111(1):33–38. <https://doi.org/10.1289/ehp.5458>
- Rodríguez I, Sandra GA, Rafael VP, Carmen MV, Josefina CE, del Carmen CE, Rocio GM, Francisco AH, Elena CS (2012) Evaluation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) adduct levels and DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to polycyclic aromatic hydrocarbons with or without animal metabolic activation. *Toxicol Mech Methods* 22(3):170–183. <https://doi.org/10.3109/15376516.2011.623330>
- Sakkas D, Alvarez JG (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93:1027–1036
- Sanguinetti CJ, Dias Nieto E, Simpson AJ (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17(5):914–921
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35(3):206–221
- Wang L, Zhao Y, Liu X, Huang T, Wang Y, Gao H, Ma J (2015) Cancer risk of petrochemical workers exposed to airborne PAHs in industrial Lanzhou City, China. *Environ Sci Pollut Res Int* 22(24):19793–19803. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5203-2>
- World Health Organization (WHO) (2010) Reference values for human semen characteristics, 5th edn. Cambridge University Press, Cambridge
- Xia Y, Han Y, Zhu P, Wang S, Gu A et al (2009) Relation between urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and human semen quality. *Environ Sci Technol* 43(12):4567–4573. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=4646903;rs=1048943](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=4646903;rs=1048943). Accessed 27 July 2017



# 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 isoamílico (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 sí 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

## ABSTRACT

**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), 56-65. doi: 10.15174/au.2016.1078

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: rebecapms@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 isoamílico (FCI), 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<sup>®</sup> 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 amplificadas, 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 alícuotas de 1 ml de cada muestra y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su uso. Cada alícuota 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 evaporización 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 nano-espectrofotometría 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 AXYGEM®.

### Genotipificación de polimorfismos

Para el análisis de PCR múltiple se amplificaron tres genes polimórficos simultáneamente; los oligonucleótidos *Fwd* gaactccctgaaagctaaagc, *Rvs* gttgggctcaaa-tatacggtgg que amplifican un fragmento de 480 pb que corresponde al gen *GSTT1*; como control interno se utilizaron los oligonucleótidos *Fwd* gaactgccacttcagct-gtct, *Rvs* cagctgcatttgaagtgtctc que amplifican 312 pb del gen *CYP1A1*; y finalmente los oligonucleótidos *Fwd* ttctactgtgtcctcacatctc, *Rvs* tcaccggatcatggccagca 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 homociga resultan negativos para la reacción de PCR, sin embargo, los heterocigos y los

homócigos 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* ctgtctccctctggttacaggaagc y *Rvs* ttccagccgttcgacagcatagcc 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 homócigo silvestre genera fragmentos de 149 pb y 55 pb, el heterócigo 204 pb, 149 pb y 55 pb, mientras que el homócigo polimórfico pierde el sitio de restricción y se observa una banda de 204 pb (Cascorbi, Brockmüller & 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 arilos, 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* ggcaagataactgcaccga, *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 ± 0.11; 2.52 ± 0.70; 1.77 ± 0.08; 1.80 ± 0.04 y 1.74 ± 0.24, respectivamente; mientras que en la cantidad expresada en ng/µl se obtuvieron 136.76 ± 115.18; 29 ± 28.8; 23.19 ± 7.42; 211.93 ± 103.93 y 189.02 ± 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).

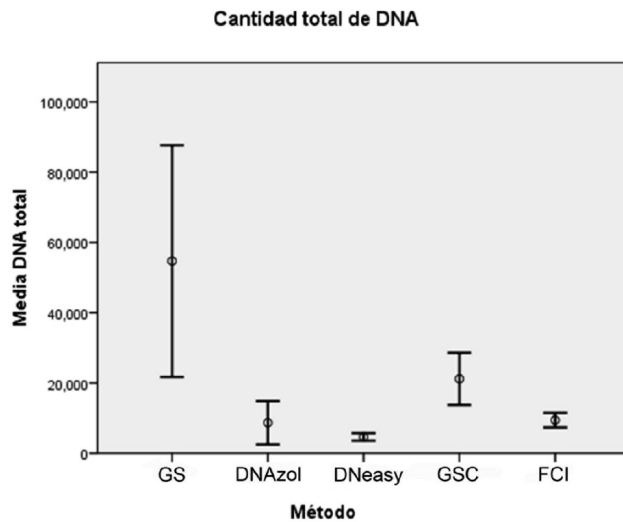
La integridad del DNA se analizó por electroforesis y se observó DNA de elevado peso molecular en todas las muestras aisladas por los diferentes métodos (figura 2).

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).

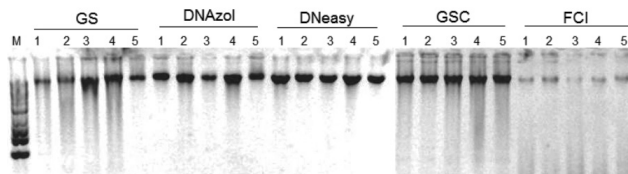
Tabla 1. Parámetros de pureza y cantidad de DNA obtenidos en distintos métodos de extracción.

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

Fuente: Elaboración propia.



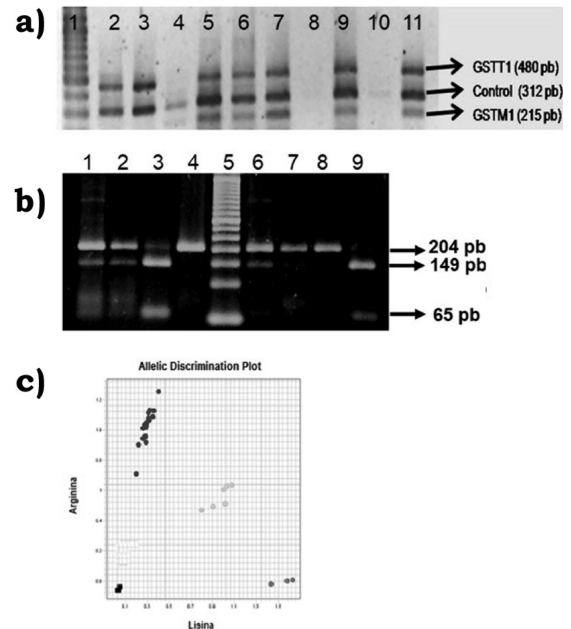
**Figura 1.** El método GS recupera  $54.6 \mu\text{g} \pm 46.0$ , DNAzol  $8.7 \mu\text{g} \pm 8.6$ , DNeasy  $4.6 \mu\text{g} \pm 1.48$ , GSC  $21.1 \mu\text{g} \pm 10.3$  y FCI  $9.4 \mu\text{g} \pm 2.8$  ( $p=0.03$ ). Fuente: Elaboración propia.



**Figura 2.** Gel de integridad de DNA. Se muestran cinco muestras representativas, purificadas por los diferentes métodos. Para visualizar bien las bandas se cargaron ~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 ámbos 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



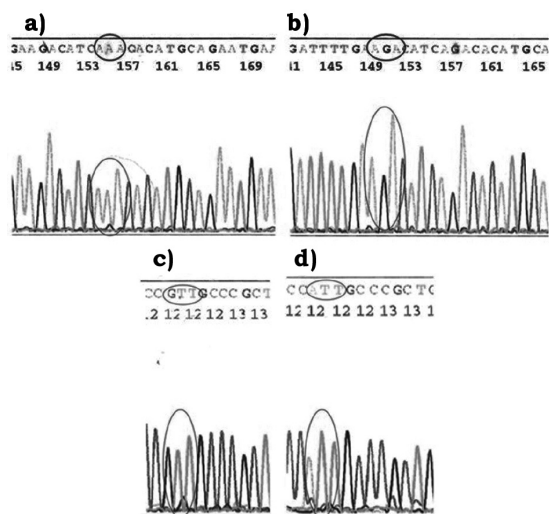
**Figura 3.** Métodos de genotipificación por PCR. A) PCR múltiple para las deleciones en los genes *GSTM1* y *GSTT1*. a) Las muestras de los carriles 5, 6, 7, 9 y 11 son positivas para ambos genes, las muestras de los carriles 2 y 3 son positivas para *GSTT1*, la muestra del carril 4 es negativa para 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 heterocigotas con genotipo Ile/Val, las muestras del carril 7 y 8 son homocigotas 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 homocigotas Lys/Lys, las muestras en el eje Y corresponden a homocigotas Arg/Arg, mientras que los intermedios corresponden a los heterocigotas 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* Ile482Val. 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 & Mambuscay, 2009). La técnica de FCI 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,  $MgCl_2$ , 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  $NaClO_4$  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* Ile462Val y *AhR* Arg554Lys.

Técnica	PCR múltiple punto final		PCR-RFLP		PCR tiempo real	
	% Amplificación	Concordancia <sup>a</sup>	% Amplificación	Concordancia <sup>a</sup>	% Amplificación	Concordancia <sup>a</sup>
GS	100	100	100	100	100	100
GSC	100	100	100	100	100	100
FCI	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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup> y DNeasy<sup>®</sup>, 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<sup>®</sup> y del 50% con DNAzol<sup>®</sup>; es posible que la baja cantidad de DNA obtenida mediante DNeasy<sup>®</sup> pueda producir un bajo número de copias del amplión y esto interfiera con el análisis de restricción; en el caso de DNAzol<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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., Mendy, 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.

Cascorbi, I., Brockmüller, 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), 1329-1332.

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., & Mambuscay, 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-Macias, H., Mendoza-Posadas, A. D., Martínez-Ramírez, O. C., Castro-Hernández, C., Gonsébat, 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.