



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Determinación de los aductos BPDE-DNA en
placenta de mujeres de la Ciudad de México**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

ANA KAREN QUERO PACHECO

ASESORA:

Dra. María del Carmen García de León Méndez

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de los aductos BPDE-DNA en placenta de mujeres de la Ciudad de México.

Que presenta la pasante: **Ana Karen Quero Pacheco**

Con número de cuenta: **415083171** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Agosto de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. María del Carmen García de León Méndez	
SECRETARIO	M. en C. Enrique Ramos López	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. María Llasbeth Hernández Calderón	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*



El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina de la UNAM con el INMEGEN, a cargo del Dr. Felipe Vadillo Ortega, siendo mi tutora la Dra. María del Carmen García de León Méndez.

A mis padres
A mi hermanito

Agradecimientos

♥ *A la Dra. Maricarmen:*

Gracias por todo el apoyo brindando desde el primer día, por las enseñanzas, por la paciencia y por la confianza depositada en mí. Además, por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

♥ *A la Unidad de Vinculación Científica UNAM-INMEGEN:*

Especialmente, gracias al Dr. Felipe Vadillo Ortega por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, así como por las aportaciones a mi trabajo. Gracias a Melissa y Ernesto por ayudarme con los resultados. A Iván, Isa y Eli por su amistad.

♥ *A mis sinodales:*

Gracias a la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, el M. en C. Enrique Ramos López, la Dra. Dolores Molina Jasso y la Q.F.B María Llasbeth Hernández Calderón por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y sus aportaciones al mismo.

♥ *A Elsa y Baltazar:*

Gracias papis porque siempre me apoyaron para continuar y lograr mis metas, por todo su esfuerzo para que no me faltara nada día con día, porque siempre estuvieron al pendiente de mí sin importar la distancia. Por estar en mis alegrías y tristezas, por su amor incondicional. Esto es por y para ustedes.

♥ *A Marco Antonio:*

Gracias hermanito por compartir cada una de las etapas de mi vida, por ser mi motivación, porque sé que nunca dejaste de creer en mí.

♥ *A Estela e Isidoro:*

Gracias tíos por todo el apoyo brindado desde que era pequeña, pero, sobre todo, por adoptarme por un tiempo como una hija más junto con Lalis y Memo. Gracias por sus consejos y enseñanzas.

♥ **A Elpidia:**

Gracias tía por siempre preocuparte por mí, por toda tu motivación, por todo el cariño que siempre me has dado.

♥ **A Carlos:**

Gracias por brindarme tu apoyo en todas mis decisiones, por motivarme día con día y no dejarme caer. Gracias por tu comprensión en todo momento, por compartir lágrimas y risas, por contagiarme siempre de tu alegría. Por todo tu amor. Gracias por no soltar de mi mano.

♥ **A mis amigos:**

Gracias a Trillanes, Aby, Selene, Diana, Benji, Abel, Diego e Iliana por todos los momentos de alegría, estrés, enojo y risa compartidos a lo largo de la universidad, por el apoyo que siempre nos dimos los unos a los otros. Los llevo en mi corazón.

Gracias a Ivett, Kenia, Laura, Ameyari y Karen, por ser las mejores amigas a pesar de la distancia.

♥ **A la UNAM:**

Especialmente a la FES-Cuautitlán, por formarme profesionalmente, por todos los conocimientos adquiridos a través de los profesores que me impartieron clases durante cuatro años.

“Por mi raza hablará el espíritu”

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS	8
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	10
III.	ÍNDICE DE TABLAS	12
IV.	RESUMEN	13
V.	INTRODUCCIÓN	15
1.	Contaminación del aire	15
1.1	Partículas suspendidas (PM)	18
1.1.1	Clasificación de las PM	18
1.1.2	Problemas de salud asociados a PM	19
1.2	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH)	20
1.2.1	Propiedades de los PAH	20
1.2.2	Fuentes de PAH	20
1.2.3	Efectos de los PAH en la salud	21
2.	Benzo[a]pireno (B[a]P)	21
2.1	Características del B[a]P	21
2.2	Metabolismo del B[a]P	22
2.2.1	Fase I del metabolismo de B[a]P	24
2.2.2	Fase II del metabolismo de B[a]P	24
2.3	Aductos BPDE-DNA	25
2.3.1	Problemas asociados a la presencia de aductos	26
3.	Placenta	27
4.	Detección de aductos derivados BPDE-DNA	27
5.	Antecedentes	28
VI.	HIPÓTESIS	30
VII.	OBJETIVOS	30
1.	Objetivo General	30
2.	Objetivos particulares	30
VIII.	METODOLOGÍA	31
1.	Diagrama del proyecto	31
2.	Población de estudio	32
2.1	Criterios de inclusión y exclusión	32
3.	Extracción de DNA	32
4.	Cuantificación y pureza del DNA	33
5.	Hidrólisis del DNA	33
6.	Purificación de tetroles	34
7.	Identificación y cuantificación de los tetroles	34
7.1	Condiciones de corrimiento	34
7.2	Acondicionamiento de reactivos	34
7.3	Estándares	35
7.4	Preparación de los tetroles para la curva de calibración	35
7.5	Curva de calibración	36

7.6 Análisis de muestras mediante HPLC	39
7.7 Cálculo de la concentración de tetroles/# de nucleótidos	39
8. Análisis estadístico	39
IX. RESULTADOS	40
1. Purificación de DNA de placenta	40
2. Determinación de aductos	41
3. Localización geográfica de las mujeres	46
X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
XI. CONCLUSIONES	55
XII. REFERENCIAS	56
XIII. ANEXOS	63
1. Fuentes de PAH	63
2. PAH prioritarios	65
3. Receptor de Hidrocarburos de Arilo	66
4. HPLC	67
5. Cromatogramas de la curva de calibración	69

I. ABREVIATURAS

AhR: Receptor de Hidrocarburos de Arilo / Aryl Hydrocarbon Receptor

AhRR: Represor del Receptor de Hidrocarburos de Arilo / Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor

ARNT: Translocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos de Arilo / Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

B[a]P: Benzo[a]pireno

BPDE-DNA: Aductos formados por diol-epóxidos de benzo[a]pireno con el DNA

BPDEs: Diol-epóxidos de Benzo[a]pireno / Benzo[a]pyrene Diol-epoxide

CDMX: Ciudad de México

CO: Monóxido de Carbono

DNA: Ácido desoxirribonucleico / Deoxyribonucleic acid

GST: Glutación-S-transferasa

GSTM1: Glutación-S-transferasa isoforma μ

GSTP1: Glutación-S-transferasa isoforma π

GSTT1: Glutación-S-transferasa isoforma θ

HCl: Ácido Clorhídrico

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia / High Performance Liquid Chromatography

MetOH: Metanol

NAT: N-acetiltransferasas

NO₂: Dióxido de Nitrógeno

O₃: Ozono

PAH: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos / Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Pb: Plomo

PM: Partículas Suspendidas / Particulate Matter

PM 10: Partículas suspendidas con diámetro de ≤ 10 micrómetros y > 2.5 micrómetros

PM 2.5: Partículas suspendidas con diámetro de ≤ 2.5 micrómetros

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno / Reactive Oxygen Species

SIMAT: Sistema de Monitoreo Atmosférico

SO₂: Dióxido de Azufre

SULT: Sulfotransferasas

T-I: Tetrol-I

T-II: Tetrol-II

UGT: Glucoronosil transferasas

USEPA: Agencia de Protección Ambiental del Estados Unidos / United States Environmental Protection Agency

VR: Valor de Referencia

WHO: Organización Mundial de la Salud / World Health Organization

XB: Xenobióticos

XRE: Elemento de Respuesta a los Xenobióticos / Xenobiotic Response Element

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la situación actual de contaminación a nivel mundial	15
Figura 2. Mapa de monitoreo ambiental de la CDMX	17
Figura 3. Clasificación de las PM	18
Figura 4. Mecanismo de activación del AhR mediado por B[a]P	23
Figura 5. Función inhibitoria del AhRR en el metabolismo de los XB	23
Figura 6. Generación de los BPDE	24
Figura 7. Formación de los aductos de BPDE-DNA con guanina	25
Figura 8. Esquema general de trabajo	31
Figura 9. Formación de tetrol-I y tetrol-II	33
Figura 10. Curva de calibración para T-I	38
Figura 11. Curva de calibración para T-II	38
Figura 12. Imagen representativa de la cuantificación de DNA	40
Figura 13. Resultados sobre la presencia de tetroles obtenidos en el HPLC	41
Figura 14. Aductos/ 10^8 nucleótidos detectados por T-I en placenta	44
Figura 15. Aductos/ 10^8 nucleótidos detectados por T-II en placenta	44
Figura 16. Distribución de los valores de aductos detectados por T-I en placenta	45
Figura 17. Distribución de los valores de aductos detectados por T-II en placenta	45
Figura 18. Distribución de las mujeres positivas a T-I y T-II de acuerdo con los valores calculados	46
Figura 19. Localización geográfica de las mujeres participantes	47

Figura 20. Concentraciones promedio de PM10 durante los meses de enero, febrero y marzo en el año 2015.	48
Figura 21. Representación de la estructura química de la sílica	67
Figura 22. HPLC UFLC-XR de Shimadzu con detector de RF-10Axl	68
Figura 23. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [1.0 pg]	69
Figura 24. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [2.0 pg]	69
Figura 25. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [6.0 pg]	70
Figura 26. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [10.0 pg]	70
Figura 25. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [14.0 pg]	71

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores límite promedio en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM 2.5 y 10 en México	19
Tabla 2. Características fisicoquímicas de los estándares puros de T-I y T-II	35
Tabla 3. Preparación de la curva de calibración de T-I	36
Tabla 4. Preparación de la curva de calibración de T-II	36
Tabla 5. Preparación de la curva de calibración para la mezcla de tetroles	37
Tabla 6. Tiempos de retención para T-I y T-II	37
Tabla 7. Concentraciones de T-I y T-II determinadas por HPLC	42
Tabla 8. Número de aductos producidos por T-I y T-II	43
Tabla 9. Prueba de normalidad para datos de T-I y T-II	46
Tabla 10. Nombre y estructura química de los dieciséis PAH prioritarios establecidos por la USEPA	65

IV. RESUMEN

En el año 2013, el grupo del Dr. Felipe Vadillo publicó un estudio prospectivo que evaluó las evidencias que respondían a la hipótesis que proponía que en una cohorte de mujeres embarazadas residentes en la CDMX *“la exposición a la contaminación atmosférica puede ser una causa importante de prematuridad”*, ya que muchos estudios publicados, carecían de los datos clínicos individuales necesarios para dilucidar los posibles mecanismos biológicos que median estas asociaciones epidemiológicas. El presente trabajo forma parte de las actividades que buscan evaluar el impacto que genera la alta densidad de contaminantes en una ciudad, como la CDMX, y los distintos resultados adversos al nacimiento o sucesos que pudieran estar relacionados.

La contaminación ambiental es un tema de interés a escala global, tanto por el impacto sobre el medio ambiente como de los problemas en la salud de la población. Existen distintos compuestos contaminantes en el aire, entre los cuales podemos mencionar a las partículas suspendidas (PM) que absorben y transportan a su vez, a otros compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) los cuales surgen como productos resultantes de la pirólisis incompleta de combustibles empleados en las distintas actividades diarias.

Se han catalogado 20 principales PAH por sus efectos mutagénicos, cancerígenos y/o teratogénicos, dentro de este grupo se encuentra el benzo[a]pireno (B[a]P), el cual al ingresar al organismo es metabolizado por enzimas del CYP450, epóxido hidrolasa y glutatión-s-transferasa (GST), generando, como consecuencia, moléculas conocidas como diol-epóxidos de B[a]P (BPDE). Los BPDE son especies reactivas las cuales, al reaccionar con algunas macromoléculas, por ejemplo, el DNA, dan lugar a la formación de aductos BPDE-DNA, los cuales pueden ser detectados por diversos métodos analíticos. La hidrólisis ácida de los aductos de BPDE-DNA da lugar a las moléculas conocidas como tetrol-I y tetrol-II, detectables por HPLC.

Este proyecto se enfocó en la determinación de la presencia de aductos en muestras de DNA de placenta ya que, al ser un órgano vital de intercambio entre la madre y el feto durante el periodo gestacional, puede ser el sitio en donde ocurre la concentración de los aductos BPDE-DNA. Los resultados arrojaron concentraciones de estas estructuras, menores a las esperadas, sin embargo, el hecho de que la CDMX esté catalogada como una ciudad con altos índices de

contaminación, no implica que exista o no, una correlación sobre su formación en el organismo de las mujeres gestantes.

V. INTRODUCCIÓN

1. Contaminación del aire

La contaminación es la modificación de la composición natural del aire debida a la presencia de sustancias o compuestos, emitidos por fuentes naturales o antropogénicas, en concentraciones que pueden tener un impacto nocivo para la salud humana o el medio ambiente (63).

La contaminación afecta a todas las regiones del mundo (**Figura 1**). Sin embargo, las poblaciones que habitan en ciudades de bajos ingresos son las más afectadas. De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (WHO), respecto a los datos relacionados con la calidad del aire, el 97% de las ciudades con más de 100,000 habitantes, localizadas en países con ingresos bajos y medios, no cumplen con las pautas establecidas. Así mismo, en los países de ingresos altos, ese porcentaje disminuye a 49% (76).

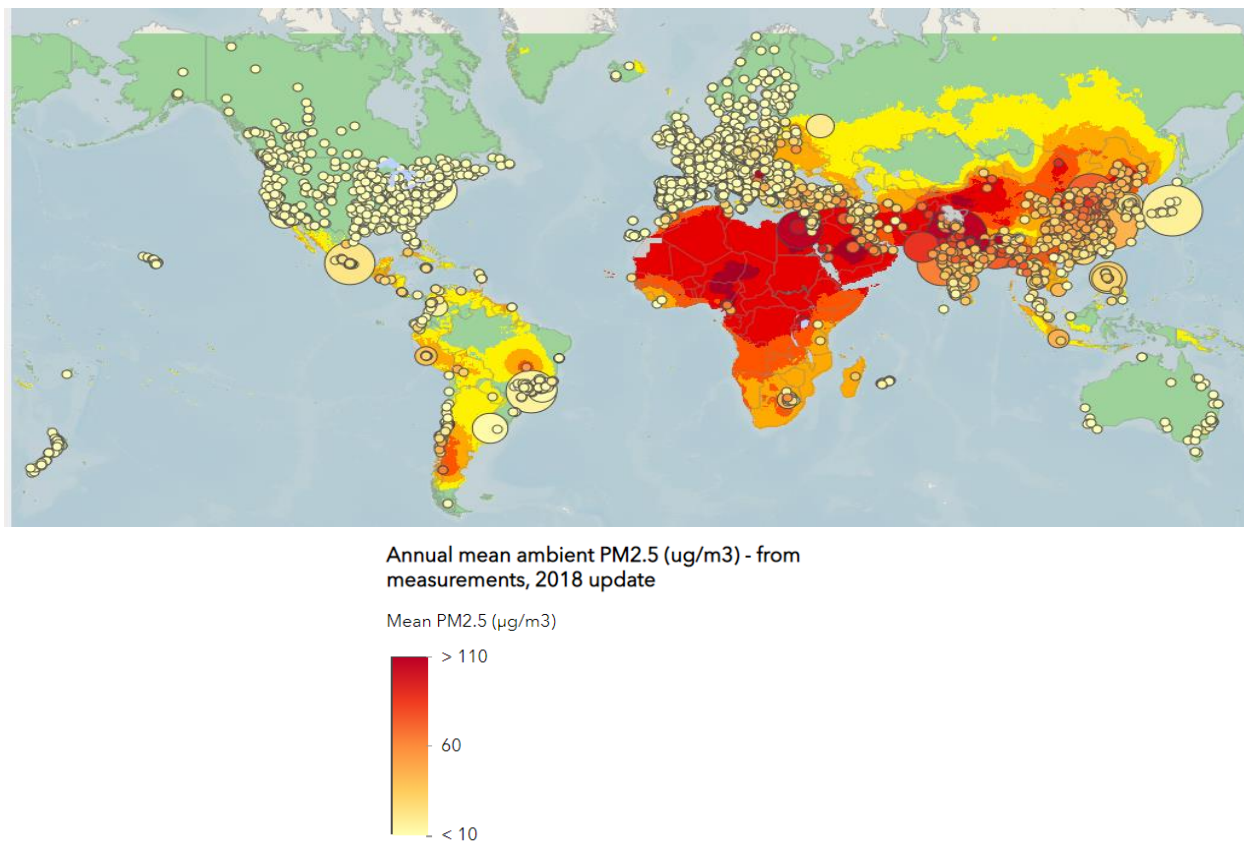


Figura 1. Mapa de la situación actual de contaminación a nivel mundial. Plataforma Mundial de Calidad y Salud del aire (76).

A partir de la información reportada en el 2018, Tetovo, Macedonia, es la ciudad con mayor índice de contaminación, seguida por ciudades ubicadas en la India, China y Vietnam principalmente. En lo que respecta a América Latina, México es el país que presenta el nivel mayor de contaminación. Tomando en cuenta esto, la WHO ha realizado análisis sobre la calidad del aire en las ciudades que conforman la República Mexicana, entre las cuales, tomando en cuenta los datos del 2018, Monterrey, Ciudad de México (CDMX) y Guanajuato ocupan los tres primeros lugares respectivamente.

Durante el transcurso de los daños, se han realizado estudios para catalogar a los principales contaminantes ambientales. Desde 1970, Estados Unidos de América ha establecido los estándares de calidad del aire con base en los niveles de seis contaminantes, los cuales son: Dióxido de Azufre (SO_2), Monóxido de Carbono (CO), Dióxido de Nitrógeno (NO_2), Ozono (O_3), Plomo (Pb) y Partículas Suspendidas (PM); diversas agencias reguladoras alrededor del mundo han adoptado dichos estándares para su monitoreo ambiental.

La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) encargada de proporcionar protección a la salud, el medio ambiente y a los recursos naturales, establece una serie de estándares para su desempeño clasificados en dos grupos, el primero recibe el nombre de estándares primarios, los cuales brindan protección a la salud pública, mientras que el segundo grupo, llamado estándares secundarios involucra la protección contra la disminución de la visibilidad, daños a animales, cultivos, vegetación y edificios (66).

Por su parte, en México, específicamente en la CDMX, existe un programa denominado Sistema de Monitoreo Atmosférico (SIMAT) (63), perteneciente a la Secretaría del Medio Ambiente, en donde se recopila información de los contaminantes del aire y parámetros meteorológicos, describiendo el origen, los efectos sobre la salud, el método de medición y la situación actualizada de cada parámetro; Los compuestos que mide el SIMAT son: SO_2 , CO , NO_2 , O_3 y PM , para lo cual, se utilizan equipos que cumplen con las características requeridas para elaborar un método de referencia o método equivalente, empleado o reportado por la USEPA y con las especificaciones en la Norma Oficial Mexicana para cada contaminante.

El SIMAT obtiene un registro diario de los distintos monitores ubicados en la ciudad, proporcionando un mapa de la situación de los contaminantes en cuestión los cuales son de libre acceso a la población (**Figura 2**).

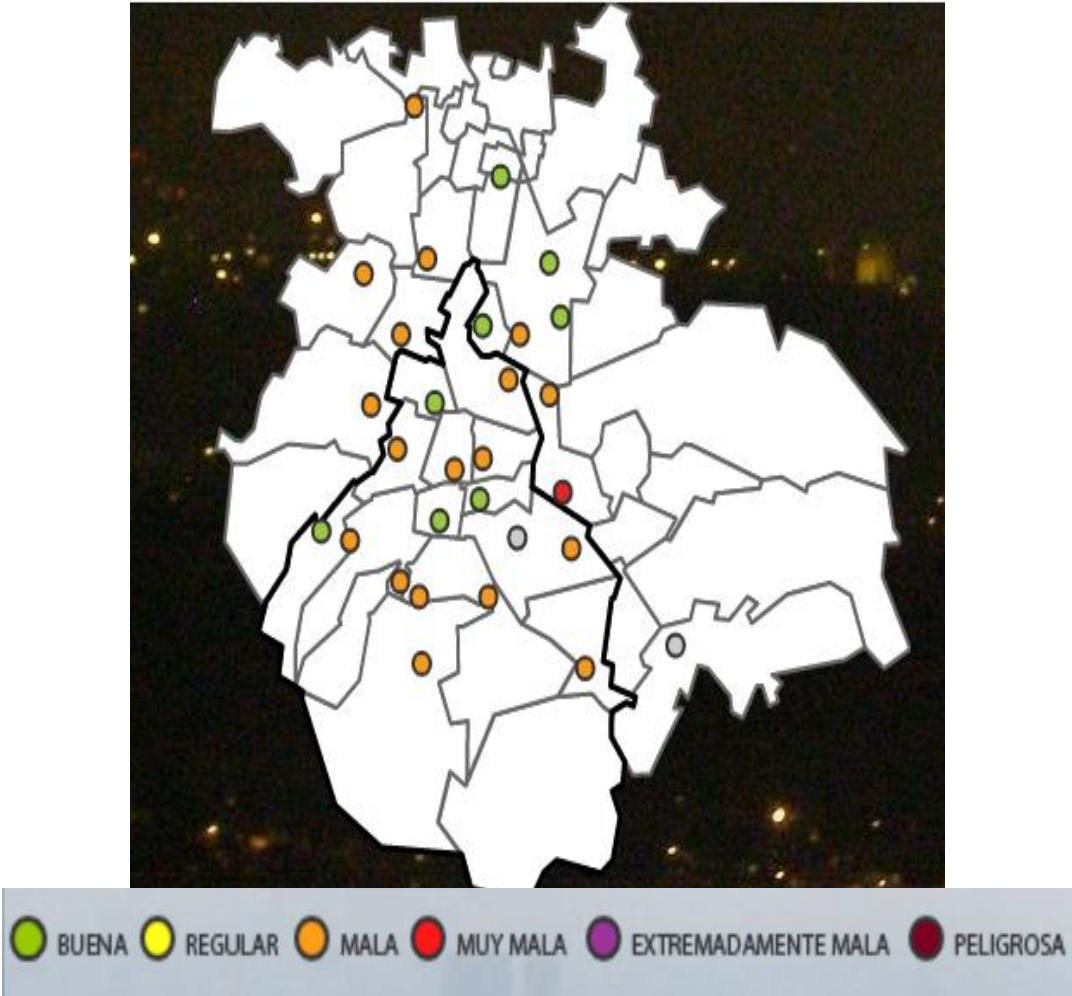


Figura 2. Mapa de monitoreo ambiental de la CDMX (63).

1.1 Partículas suspendidas (PM)

Cuando dos partículas chocan en el aire, tienden a adherirse entre sí, formando partículas progresivamente más grandes. Estas pueden ser emitidas como tal a la atmósfera o bien ser generadas por reacciones químicas, son conocidas como PM, y son una mezcla heterogénea de partículas sólidas y líquidas suspendidas en el aire, cuya composición varía en tiempo y espacio (**Figura 3**). Los constituyentes de las PM son muy variables, ya que pueden estar compuestas de: nitratos; sulfatos; carbono elemental y orgánico, además de, los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH); compuestos biológicos, como endotoxinas, fragmentos celulares; y metales, como hierro, cobre, níquel, zinc y vanadio (76).

1.1.1 Clasificación de las PM

Para su identificación, debido a que son de tamaño, forma y composición variada, las PM se han clasificado en:

PM 10: partículas inhalables que presentan un diámetro > 2.5 y ≤ 10 micrómetros

PM 2.5: partículas inhalables cuyos diámetros suelen ser de ≤ 2.5 micrómetros.

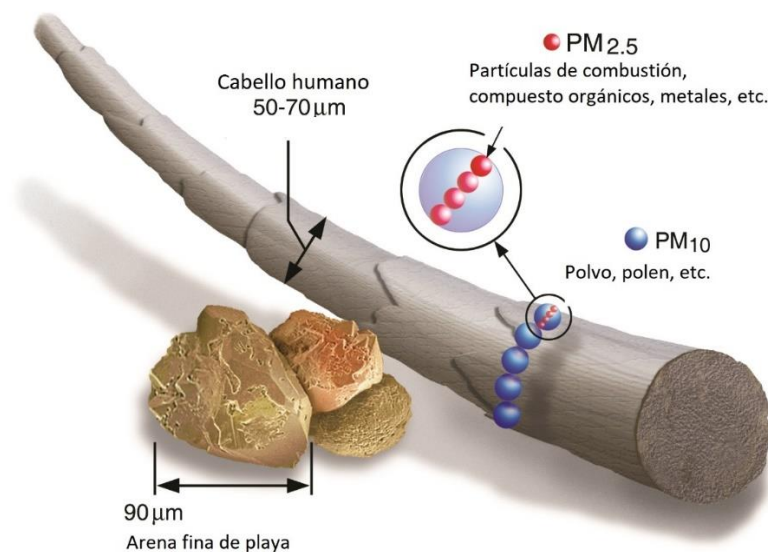


Figura 3. Clasificación de las PM (66).

Debido a su tamaño, las partículas tienden a suspenderse en el aire durante largos períodos de tiempo (semanas o meses) y, por lo tanto, pueden ser desplazados a grandes distancias (36).

1.1.2 Problemas de salud asociados a PM

El tamaño de las partículas está directamente relacionado con su potencial para causar alteraciones en la salud. Cuanto más pequeña sea una partícula, más fácilmente es depositada en el tracto respiratorio afectando el intercambio de gases en los pulmones y, eventualmente, pasando al torrente sanguíneo (26). Por lo tanto, las que provocan los mayores problemas son las PM 2.5.

Por esta razón, numerosos estudios científicos han relacionado la exposición a la contaminación por PM, con una gran variedad de problemas, entre ellos: muerte prematura en personas con enfermedad cardíaca o pulmonar, ataques cardíacos no fatales, latido del corazón irregular, asma, disminución de la función pulmonar, irritación de las vías respiratorias, tos o dificultad para respirar, etc (66).

Se ha sugerido que la exposición a altos niveles de PM puede inducir, bebés con bajo peso al nacer, partos prematuros y posible muerte fetal e infantil (31).

La magnitud de los efectos depende, tanto de sus concentraciones en el aire, la dosis que se inhala, el tiempo y la frecuencia de exposición, así como de las características de la población expuesta. De este modo, la normatividad mexicana a través de la Secretaria de Salud en la NOM (47) establece los valores límites incluidos en la siguiente tabla, tanto para PM 2.5 como para PM 10:

Tabla 1. Valores límite promedio en $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de PM 2.5 y 10 en México

Partícula	Valor promedio en 24 hrs [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Valor promedio anual [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
<i>PM 2.5</i>	45	12
<i>PM 10</i>	75	40

1.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH)

Los PAH forman parte, entre otros compuestos, de las PM y constituyen una familia de compuestos ampliamente distribuida en el medio ambiente, caracterizada por contener dos o más anillos (en su mayoría de benceno), unidos entre sí, formando estructuras aromáticas, por lo que también se les conoce como “hidrocarburos polinucleares” (73). Tanto el grado de saturación como la configuración espacial de los PAH son importantes, pues determinan algunas de sus características químicas y biológicas y, así mismo, su posible efecto sobre la salud.

1.2.1 Propiedades de los PAH

Las características de los PAH son muy diversas; algunos de ellos son semivolátiles, es decir, que están en forma gaseosa a temperatura ambiente, mientras que otros tienen un elevado punto de ebullición. En general son lipofílicos, característica que se incrementa con la complejidad de los compuestos y su masa molecular (73) y, fotoquímicamente inestables, además, mientras más átomos y anillos formen la molécula del PAH, mayor es su afinidad por las grasas.

1.2.2 Fuentes de PAH

Estos compuestos son formados durante procesos de pirólisis y combustión incompleta de materia orgánica, el proceso ocurre a través de la formación de radicales libres, producidos por la ruptura de enlaces C-C y C-H (1). Por esto, no se presentan en la naturaleza como compuestos individuales, sino en mezclas complejas, la composición y concentración de sus componentes dependerá del tipo de material y de las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la combustión.

En general, los seres vivos pueden estar en contacto con PAH al respirar el aire, consumo de cigarros y por alimentos que han sido cocinados por diversas técnicas de cocción. **Ver anexo 1.**

1.2.3 Efectos de los PAH en la salud

Los PAH pueden afectar negativamente tanto a la salud, como al medio ambiente. Estudios experimentales han demostrado que muchos de ellos son genotóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos.

Los efectos detectados, tanto en animales de laboratorio como en modelos celulares tras la exposición a PAH han sido: daño en células sanguíneas (pancitopenia, depresión de la médula ósea y destrucción de células madre hematopoyéticas) (38) (6), en células de pulmón (hiperplasia alveolar y bronquial) (54) (49) (10), células hepáticas (presencia de tumores) (24) (28), disminución de la actividad reproductiva en ratas hembra (mostrado sólo por benzo[a]pireno B[a]P), así como una disminución en el peso fetal de las crías (61) y, por último, daño al ácido desoxirribonucleico (DNA) (15). Igualmente, los estudios realizados en humanos han demostrado efectos similares. Debido a la transformación que sufren estos compuestos en metabolitos reactivos, se les ha catalogado como responsables de procesos carcinogénicos, entre otros destaca el cáncer de pulmón asociado al consumo de tabaco (51) (41) (19).

La USEPA ha decretado dieciséis PAH como prioritarios (**Ver anexo 2**) por los efectos causados en organismos vivos, en esta lista se incluye al B[a]P, el cual, es uno de los más estudiados y el compuesto de interés en este trabajo.

2. Benzo[a]pireno (B[a]P)

2.1 Características del B[a]P

Un miembro importante de la familia de PAH es el B[a]P, formado por cinco anillos bencénicos, presenta un punto de fusión y de ebullición de 179 y de 495°C respectivamente (25), es altamente volátil, soluble en compuestos orgánicos lipofílicos. Los cristales de B[a]P puro son de color amarillo pálido y semejantes a agujas (66).

2.2 Metabolismo del B[a]P

Tomando en consideración las fuentes de B[a]P mencionadas en el anexo 1, existen dos vías principales de exposición a este compuesto, la vía respiratoria y la oral.

La naturaleza lipofílica del B[a]P favorece su difusión y transporte en el organismo a través de las membranas celulares, así como su almacenamiento en tejidos grasos incluyendo tejido mamario y médula ósea. Una vez metabolizado dentro de la célula, se puede localizar en diferentes organelos, por ejemplo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, membrana plasmática y envoltura nuclear. Sin embargo, también se ha encontrado acumulado en el núcleo, lisosomas y matriz mitocondrial (37).

El metabolismo del B[a]P comienza con la activación del Receptor de Hidrocarburos de Arilo (AhR) (**Ver anexo 3**), el cual es un factor de transcripción citoplasmático que desempeña un papel importante en metabolismo de xenobióticos (XB).

En estado latente el AhR se encuentra formando parte de un complejo multiprotéico, su activación se inicia con la unión de un ligando, que en este caso es el B[a]P; una vez activado, el AhR es translocado al núcleo en donde se disocia del complejo multiprotéico, formando un heterodímero con el Traslocador nuclear de AhR (ARNT) el dímero formado, se une posteriormente a una secuencia consenso en el DNA (5' GCGTGA 3') conocida como elemento de respuesta a los XB (XRE). Esta unión inicia la transcripción de los genes (70) que codifican para las enzimas que participan en la fase I del metabolismo de XB, como las dependientes del citocromo p450 (CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1); y las de la fase II, como Glucoronosil transferasas (UGT), Sulfottransferasas (SULT), N-acetiltransferasas (NAT) y glutatión-S-transferasa (GST) (75) (**Figura 4**).

La transcripción puede ser inhibida por la presencia del represor del receptor de hidrocarburos de arilo (AhRR), el cual se encuentra en el núcleo, sitio en el que se localiza también el ARNT. Ya en el núcleo, ambas moléculas (AhR y AhRR) pueden competir entre sí por el ARNT para formar, ya sea, un dímero que induce la transcripción de las enzimas para el metabolismo de los XB (AhR/ARNT) o bien, un dímero que inhibe su transcripción (AhRR/ARNT) (8) (**Figura 5**).

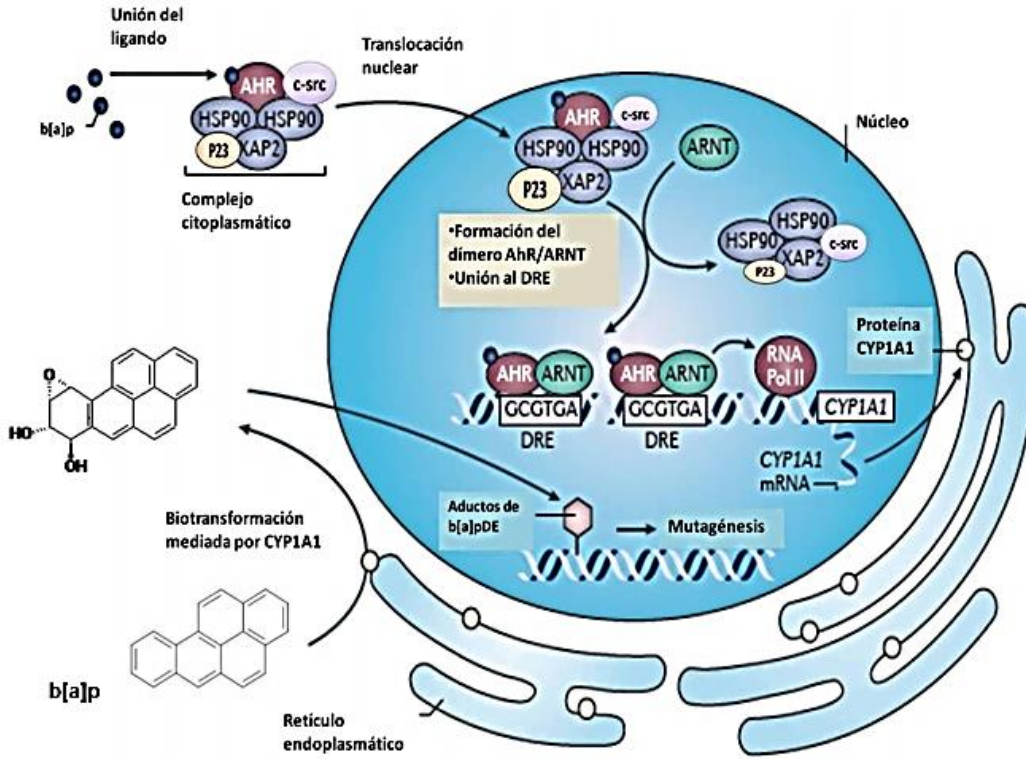


Figura 4. Mecanismo de activación del AhR mediado por B[a]P (70).

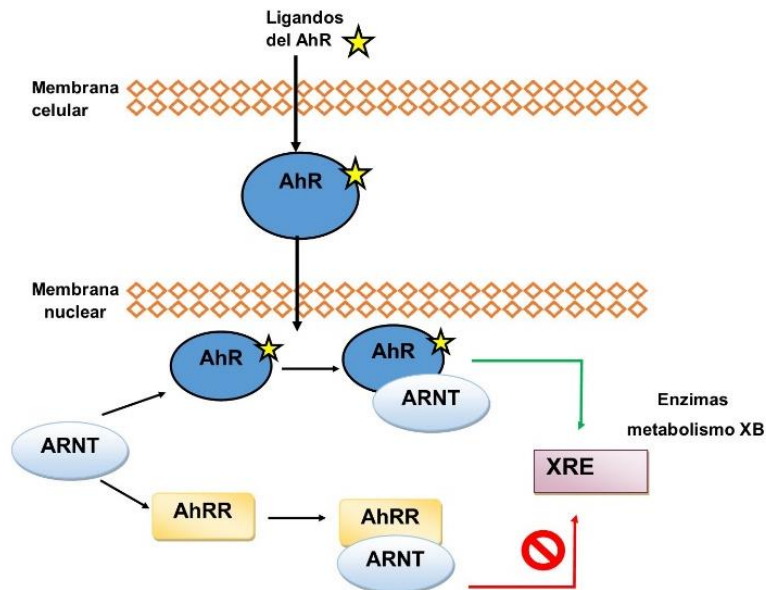


Figura 5. Función inhibitoria del AhRR en el metabolismo de los XB. Elaboración propia.

2.2.1 Fase I del metabolismo de B[a]P

Inicialmente, el B[a]P es oxidado por el CYP1A1 para formar los **epóxidos (\pm) B[a]P-7,8**, con una tasa de conversión mucho más alta del enantiómero (+); este epóxido resultante es hidrolizado rápidamente por la enzima microsomal epóxido hidrolasa (EH), formando los **dioles \pm B[a]P-7, 8** los cuales pueden ser oxidados adicionalmente por la acción del CYP1A1 para formar los últimos metabolitos de la vía: **(+)-B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxido (I y II)** y **(-)-B[a]P-7,8-diol-9,10-epóxido (I y II)**, conocidos como dioles-epóxidos de benzo[a]pireno (BPDE) (**Figura 6**), los cuales son considerados altamente reactivos (12).

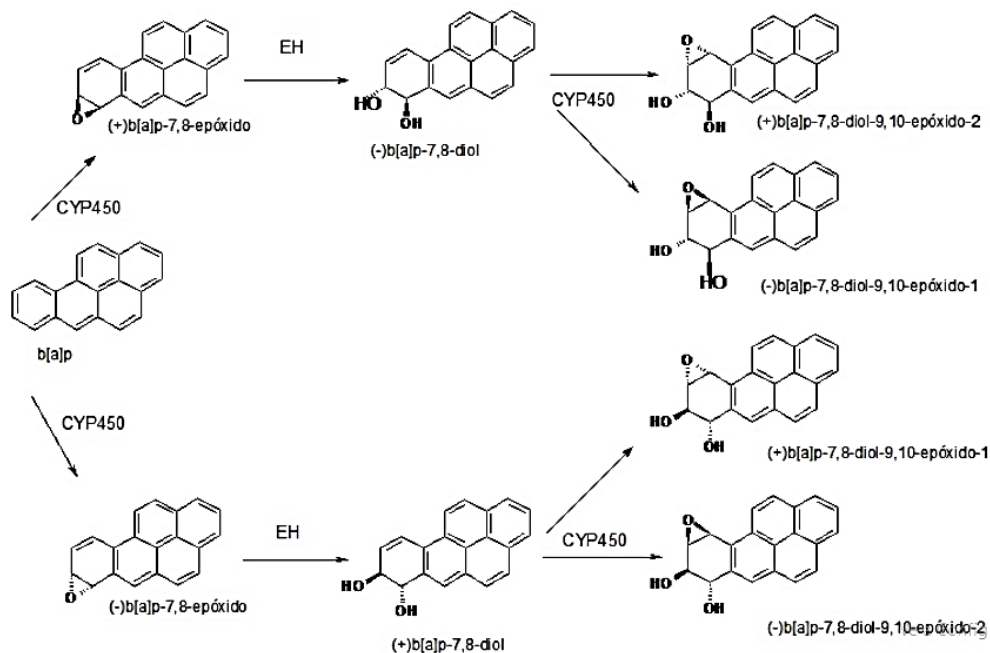


Figura 6. Generación de los BPDE (70).

2.2.2 Fase II del metabolismo de B[a]P

Esta fase consiste en la conjugación de los BPDEs generados en la fase I, con moléculas polares. Las enzimas de la fase II que catalizan la conjugación tienen diferente especificidad por sustratos y su nivel de expresión depende del tipo de tejido y el estado de desarrollo del individuo, además, pueden ser inducibles o inhibidas por XB. Las principales enzimas que

participan en esta fase son las enzimas GST, mismas que catalizan la conjugación del glutatión con BPDE, lo que generalmente disminuye la hidrofobicidad de los BPDE, por lo tanto, aumenta su excreción por medio de la bilis u orina (70). Las isoformas de GST mejor conocidas son GST μ , ψ y π ; las μ y π tienen múltiples sustratos, entre los cuales se encuentran los BPDEs. La isoforma μ al conjugarse, presenta la mayor actividad enzimática seguida de las isoformas ψ y π (71).

2.3 Aductos BPDE-DNA

Las conformaciones estructurales de los BPDE permiten la apertura del anillo para formar iones carbonilo, especies reactivas que interaccionan con los nucleótidos, para formar aductos covalentes (**Figura 7**). En biología, un aducto es un complejo que se forma cuando un compuesto altamente reactivo se une a una sustancia química, endógena o exógena o, a una macromolécula como ADN y/o proteínas (30).

Debido a las interacciones nucleofílicas, las uniones covalentes generadas con el DNA, se llevan a cabo principalmente con guanina y adenina; el grupo amino exocíclico de la guanina ataca la posición C-10 (apertura del epóxido) del BPDE, lo que da lugar a la formación del aducto en la posición N-2 de la guanina (43), mientras que, para la adenina, la sustitución se lleva a cabo en la posición N-6 (22).

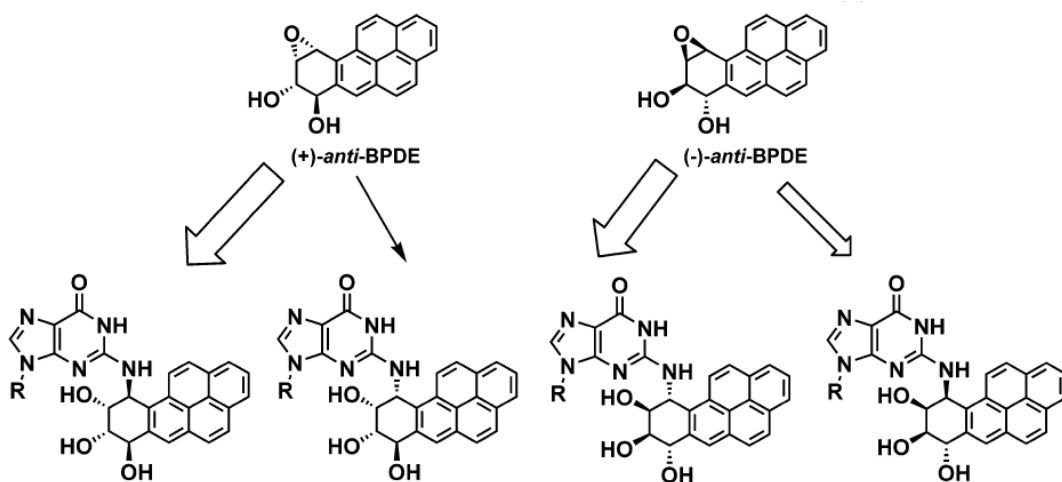


Figura 7. Formación de los aductos BPDE-DNA con guanina (43).

2.3.1 Problemas asociados a la presencia de aductos

Existen puntos de control que identifican la existencia de algún daño en la secuencia de DNA los cuales pueden retrasar la progresión del ciclo celular, a fin de brindar una oportunidad para la reparación. Dependiendo del nivel de daño, se puede retrasar una respuesta destructiva de la célula o desencadenar apoptosis (33). El DNA interpreta la presencia de aductos como daño, por lo que se activan los sistemas de reparación enzimática, los cuales eliminan directamente el aducto o la base del DNA aductada (reparación por escisión de la base) o, eliminan al nucleótido que contiene la base aductada (reparación por escisión de nucleótido) (60).

En general, la estabilidad de los aductos es variable dependiendo de los compuestos responsables de su formación, sin embargo, las uniones generadas por los BPDE con el DNA son altamente estables por lo que difícilmente son eliminados y, como consecuencia, se generan cambios en la etapa de replicación, en el marco de lectura de los nucleótidos afectados, ejemplos de estos son transversiones de **G → T** y transiciones **G → A**. A su vez, estos cambios conducen a mutaciones que activan los protooncogenes o desactivan los genes supresores de tumor (22).

A nivel de DNA, los cambios mencionados pueden alterar a diversos genes, los cuales se traducen en proteínas y éstas a su vez pueden ser modificadas en su función al grado de que, inclusive, no pueden ser expresadas por la célula (14). Uno de los genes que puede sufrir este tipo de alteraciones es el que codifica para la proteína p53 (7). Como sabemos, numerosas funciones moleculares y celulares están asociadas con esta proteína, implicada en la apoptosis, el control del ciclo celular y la reparación del DNA (16), entre otras.

Los estudios moleculares han revelado que los aductos de DNA bloquean la actividad de replicación de la polimerasa, lo que contribuye al aumento del daño, al reducir la actividad de reparación del DNA (34). La magnitud de la formación de aductos de DNA para B[a]P y otros PAH, depende de la capacidad metabólica de las células blanco (12). Se ha reportado que los derivados de B[a]P tienen la capacidad de entrar en ciclos redox e inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que causa estrés oxidativo (5). El daño oxidativo del DNA puede contribuir a la carcinogénesis, mediante mecanismos involucrados en la modulación de la expresión génica y por la inducción de mutaciones (69).

3. Placenta

La placenta es un órgano transitorio que posee función endócrina, interviene en la nutrición, en el control del crecimiento y la regularización del metabolismo fetal, desempeñando labores correspondientes al pulmón, intestino y riñón fetales. Se encuentra integrada por tejidos vellosos epiteliales, mesenquimales y endoteliales, en los cuales se incrustan los vasos fetales. Realiza la síntesis y secreción de hormonas, incluidos los esteroides (progesterona, estrógenos), la gonadotropina coriónica humana, la hormona de crecimiento placentario, el lactógeno placentario y factores como la tirosina cinasa-1, involucrada en la regulación de la formación de vasos sanguíneos (75).

Cuando el embarazo llega a término, es decir, el parto se desencadena posterior a las 37 semanas de gestación, la placenta derivada de estos nacimientos representa un modelo que se puede emplear para realizar estudios relacionados con el metabolismo de los XB, de manera tanto *ex vivo*, como *in vitro*.

Ya que al ser la placenta la encargada de brindar protección para el feto, el daño en su DNA se puede emplear como un marcador que puede indicar la exposición y la eficiencia con la cual la madre metaboliza y elimina los XB, además de reflejar el daño al DNA que puede ocurrir en los tejidos fetales.

De esta manera, sabiendo que el B[a]P es almacenado en la placenta, se eligió este tejido como sitio para la búsqueda de aductos de BPDE-DNA.

4. Detección de los aductos BPDE-DNA

Se han descrito diversas técnicas analíticas para la detección de aductos, ejemplos de éstas son: radiomarcaje (radiolabeled), ensayos inmunológicos, el ensayo ³²P-postlabeling, espectrometría de masas y por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia/High-Performance Liquid Chromatography) (52). Los métodos mencionados presentan desventajas ante el HPLC, los cuales pueden ser, su alta sensibilidad, facilidad de uso, disminución de riesgos al usuario y principalmente el costo para su desarrollo (51), por lo que se considera la técnica más adecuada para la detección de aductos BPDE-DNA.

La técnica de HPLC (**Ver anexo 4**) se utiliza para la separación de mezclas tomando en cuenta las diferencias de afinidad a dos fases diferentes: la fase móvil, la cual dependiendo del componente a determinar puede ser una solución acuosa o, un solvente orgánico; y la fase estacionaria, un sólido poroso o gel; la separación de los diversos componentes de una mezcla es llevada a cabo por fenómenos de adsorción, es decir, las moléculas son retenidas en la superficie de la fase estacionaria. La velocidad a la que cada sustancia es eluida por la fase móvil depende de su solubilidad en esta y, de su afinidad por la fase estacionaria (42). Con base en esto, Alexandrov y cols. (3) cuantificaron indirectamente los niveles de aductos BPDE-DNA separando las moléculas que los forman, mediante la hidrólisis ácida del DNA obtenido de tejido pulmonar, mismo que se toma como base para la metodología presentada en este trabajo.

5. Antecedentes

Desde hace algunos años, el grupo del Dr. Felipe Vadillo ha realizado un proyecto el cual, busca sentar las bases para demostrar que la exposición a la contaminación atmosférica puede ser una causa importante de prematuridad. El parto prematuro es una de las principales causas de mortalidad perinatal y está asociado con consecuencias adversas para la salud a largo plazo para los lactantes sobrevivientes, la problemática que se plantea en el proyecto, trata de dar una respuesta al aumento de las tasas de nacimientos prematuros a nivel mundial, sin que se conozca a la fecha un medio eficaz para su prevención.

En el año 2013, el grupo del Dr. Vadillo (67), publicó un estudio prospectivo que evaluó las evidencias que respondían a la hipótesis que proponía que, en una cohorte de mujeres embarazadas residentes en la CDMX, *“la exposición a la contaminación atmosférica puede ser una causa importante de prematuridad”*, ya que muchos estudios publicados, carecían de los datos clínicos individuales necesarios para dilucidar los posibles mecanismos biológicos que median estas asociaciones epidemiológicas.

Su abordaje obedeció a la pregunta, ¿cómo la calidad del aire puede actuar para inducir la inflamación sistémica e influir en la duración del embarazo?

La recopilación de datos incluyó biomarcadores relevantes para la presencia de inflamación en el exudado cervicovaginal y la sangre periférica, junto con la información clínica completa, los polimorfismos de los genes de las citocinas proinflamatorias y los datos de contaminantes

locales, para evaluar la variabilidad espacial y temporal en la exposición a la contaminación atmosférica.

Las muestras se recogieron mensualmente y las participantes fueron seguidas a lo largo del embarazo. Los datos se utilizaron para evaluar si la contaminación del medio ambiente está asociada con el parto prematuro. Además, el estudio epidemiológico se complementó con un estudio toxicológico paralelo, en el que las células monocíticas en cultivo, se expusieron a muestras de partículas contaminantes, para evaluar en el sobrenadante, la expresión de los biomarcadores de la inflamación.

El presente trabajo, forma parte de las actividades que se busca evalúen el impacto que genera la alta densidad de contaminantes de una ciudad, como la CDMX, en los distintos resultados adversos al nacimiento o sucesos que pudieran estar relacionados, por esta razón, este proyecto se enfoca en la determinación de la presencia de aductos en muestras de DNA de placenta, ya que ésta, al ser un órgano vital de intercambio entre la madre y el feto durante el periodo gestacional, puede ser el blanco en donde ocurrirá la concentración de los aductos BPDE-DNA.

VI. HIPÓTESIS

Al ser la CDMX un sitio con altos índices de contaminación, se espera que la placenta de mujeres residentes en ella contenga en su DNA, aductos derivados del B[a]P.

VII. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Determinar la presencia de aductos derivados del B[a]P en muestras de DNA de placenta provenientes de mujeres embarazadas residentes en la Ciudad de México.

2. Objetivos particulares

- a) Estandarizar una técnica que permita poner de manifiesto la presencia de aductos BPDE-DNA.
- b) Realizar la determinación de aductos BPDE-DNA en muestras de tejido placentario.
- c) Aportar los datos preliminares para identificar si existen zonas en la CDMX que son especialmente peligrosas que pudieran correlacionarse con algún resultado adverso en el embarazo o posterior al parto.

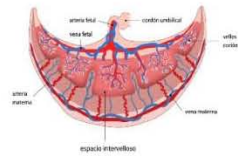
VIII. METODOLOGÍA

1. Diagrama del proyecto (figura 8).

**Población (n=118)
Mujeres embarazadas**



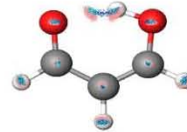
**Muestra de
tejido
placentario**



**Extracción de
DNA**



**Hidrólisis de
DNA**



**Purificación de
tetroles**



**Identificación y
cuantificación de
los aductos**



**Cálculo de la
concentración de
tetroles/#
de nucleótidos**



Figura 8. Esquema general de trabajo

2. Población de estudio

La población de estudio incluyó 118 mujeres embarazadas, entre las edades de 18 a 35, mismas que forman parte de una cohorte perinatal (Cohorte “Princesa”) del Hospital Materno Infantil Inguarán de la Secretaría de Salud de la CDMX.

2.1 Criterios de inclusión y exclusión

Las mujeres elegidas debieron cumplir los siguientes criterios para su participación

Criterios de inclusión

- a) Mujeres embarazadas residentes en la CDMX las cuales acuden al Hospital Materno Infantil Inguarán
- b) Firma de la carta de consentimiento informado
- c) Disponibilidad del expediente clínico de la paciente
- d) Mujeres embarazadas entre 18 y 35 años de edad

Criterios de exclusión

- e) Tejido placentario proveniente de mortinatos u óbito
- f) Lugar de residencia fuera del área metropolitana
- g) Expediente clínico incompleto
- h) Antecedentes de consumo de drogas y/o tabaco por parte de la paciente
- i) Mujeres <18 años ó >35 años

El proyecto desarrollado fue de tipo retrospectivo, por lo que se emplearon muestras de placenta previamente preservadas en congelación (-70°C)

A partir de las muestras de tejido placentario obtenido de estas pacientes, la metodología a seguir fue la siguiente:

3. Extracción de DNA

Con la finalidad de obtener el DNA de la placenta, conforme a la técnica descrita por el fabricante “*Puregene Blood Core Kit B*”, catálogo #1042606, Qiagen modificada. Para lo cual se partió de 200 mg de tejido placentario, una vez realizada la extracción, las muestras fueron resguardadas a 4°C para su posterior cuantificación.

4. Cuantificación y pureza del DNA

Para determinar la cantidad y pureza del DNA extraído previamente se llevó a cabo la cuantificación mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop 2000c® de ThermoFisher Scientific. La concentración de la muestra de DNA se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras que, la relación de absorbancias $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$, se utilizan para evaluar la pureza de las muestras. Para cada determinación de DNA se consideró como requerimiento un mínimo de 100 μg de DNA.

5. Hidrólisis de DNA

A partir del DNA posiblemente aductado, se llevó a cabo la hidrólisis ácida, lo que da por resultado la obtención de los nucleótidos y diferentes componentes del ácido nucleico en forma libre además de las estructuras conocidas como tetrol-I (T-I) y tetrol-II (T-II) (**Figura 9**).

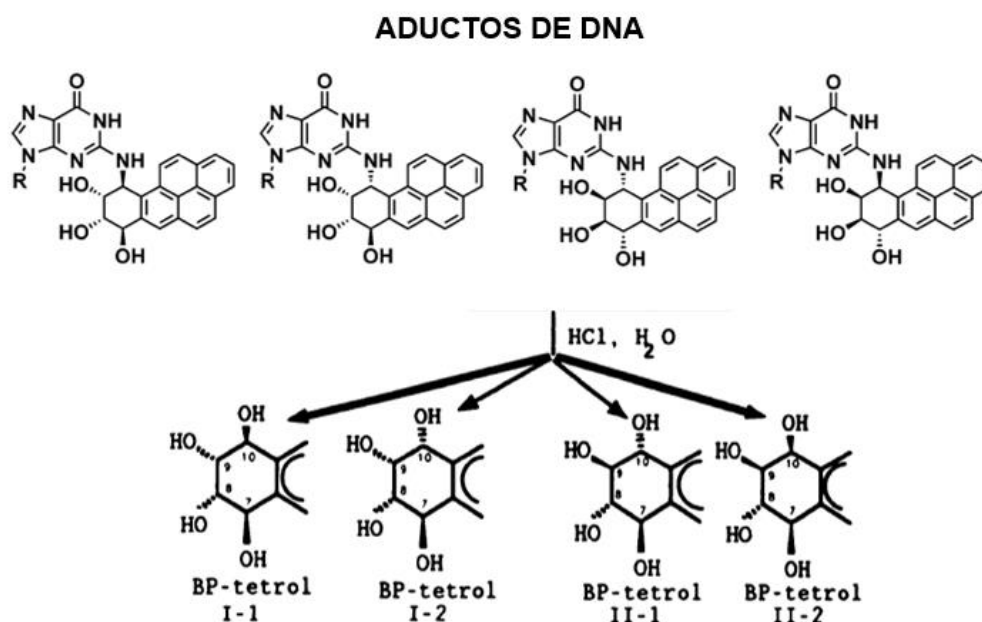


Figura 9. Formación de tetrol-I y tetrol-II. Modificado de (4) y (43).

Para esto, a partir de 200 μg de DNA se adicionaron, por cada alícuota 90 μl de DNA, 10 μl de HCl de ácido clorhídrico (HCl) 1.0 N. Posteriormente, la muestra se incubó a 90°C durante 4 horas. Finalmente, las muestras fueron resguardadas a 4°C.

6. Purificación de tetroles

Los tetroles fueron separados de la mezcla de DNA hidrolizado, por el método de cromatografía en fase reversa mediante pre-columnas (Sep-Pak® Cartridges), de C18 con tamaño de partícula de 55-105 μm , las cuales fueron activadas con metanol (MetOH) puro y lavadas con agua Milli-Q. El DNA hidrolizado, se adicionó a la columna y después de los lavados respectivos, se eluyó para llevar a cabo la recuperación de los tetroles en MetOH al 100%. Como último, las muestras eluidas, se llevaron a sequedad mediante centrifugación al vacío y se almacenaron a 4°C. Este procedimiento permite que los tetroles (en caso de que existieran) sean purificados, eluidos y recuperados en volúmenes pequeños para ser concentrados y aplicados al HPLC.

7. Identificación y cuantificación de los tetroles

7.1 Condiciones de corrimiento

El método empleado tiene fundamento en la cromatografía de fase reversa, de tal manera que los tetroles fueron separados en un equipo de HPLC modelo UFLC-XR de Shimadzu con detector de RF-10AxI espectrofluorométrico (**Ver anexo 4, figura 22**), utilizando un inyector de muestras automático Shimadzu SIL-20A para minimizar los efectos de muestreo. Así mismo, se empleó una columna analítica de 5 μm (250 x 4,6 mm, de fase reversa) empacada con C18, las muestras fueron eluidas con acetonitrilo/agua en proporción 35/65 (modo binario) a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y a una temperatura de la columna de 50 °C. La longitud de onda de excitación se fijó en 344 nm mientras que la de emisión a 398 nm. Por último, el detector se fijó a una sensibilidad media.

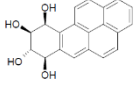
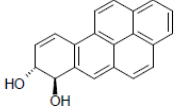
7.2 Acondicionamiento de reactivos

Los reactivos empleados para el análisis mediante HPLC (MetOH, acetonitrilo y agua Milli-Q) fueron filtrados y desgasificados.

7.3 Estándares

Para la identificación de los tetroles, T-I y T-II los estándares puros de cada uno de ellos fueron proporcionados por la Universidad de Pensilvania (Penn State Collegue of Medicine) con las siguientes especificaciones:

Tabla 2. Características fisicoquímicas de los estándares puros de T-I y T-II

Compuesto	Estructura química	Peso molecular [g/mol]	Coefficiente de absortividad molar (ϵ)	λ_{max} (nm)
Benzo[a]pyrene-r-7, t-8,c-9,c-10-tetrahydrotetrol (+) T-I		320	47 000	342
Benzo[a]pyrene-7R-trans-7,8-dihydrodiol (-) T-II		286	40 100	368

7.4 Preparación de los tetroles para la curva de calibración

Cada uno de los estándares puros, fueron procesados para la determinación de las concentraciones respectivas, mediante la siguiente ecuación:

$$M=OD/E$$

Considerando que **OD** es el valor de densidad óptica del espectrofotómetro, **E** es el coeficiente de extinción molar y **M** es la concentración en moles / litro. Por lo cual:

T-I

$$OD_{342\lambda}: 0.512$$

$$E: 47,000 \text{ mol/L}$$

$$M= 0.512 / 47000$$

$$M= 1.0893 \times 10^{-5}$$

T-II

$$OD_{368\lambda}: 0.252$$

$$E: 40,100 \text{ mol/L}$$

$$M= 0.252 / 40100$$

$$M= 6.2843 \times 10^{-6}$$

Después de obtener el valor **M**, se utilizó la ecuación siguiente:

$$\underline{C}=M*W$$

Considerando que **C** es la concentración de la muestra diluida (dilución 1:10) y **W** es el peso molecular de T-I o T-II. La concentración real de la muestra diluida debe ser:

T-I	T-II
W: 320.35 g/mol	W: 286 g/mol
M= 1.0893×10^{-5}	M= 6.2843×10^{-6}
C= (320.35) (1.0893×10^{-5})	C= (286) (6.2843×10^{-6})
C= $3.4897 \times 10^{-3} * 10$ (Factor de dilución)	C= $1.797 \times 10^{-3} * 10$ (Factor de dilución)
C= 0.0348 g/L=0.348 mg/mL = 0.0348 μ g/ μ L	C= 0.01797g/L=0.01797mg/mL=0.01797 μ g/ μ L
34.8 ng/μL en la solución original	17.97 ng/μL en la solución original

7.5 Curva de calibración

Tabla 3. Preparación de la curva de calibración de T-I

pg	Volumen (μ L)	Volumen solvente MetOH/H ₂ O 20:80 (μ L)	Volumen final (μ L)
1.0	5.74	994.26	1000
6.0	17.24	982.76	1000
10.0	28.73	971.27	1000
14.0	40.23	959.77	1000
18.0	51.72	948.28	1000

Tabla 4. Preparación de la curva de calibración de T-II

pg	Volumen (μ L)	Volumen solvente MetOH 20% (μ L)	Volumen final (μ L)
1.0	5.565	994.435	1000
2.0	11.129	988.87	1000
6.0	33.39	966.61	1000
10.0	55.648	944.35	1000
14.0	77.90	922.02	1000
18.0	100.17	899.83	1000

Ambas curvas fueron preparadas diluyendo las muestras originales en MetOH al 20% en una proporción 1:200.

Tabla 5. Preparación de la curva de calibración para la mezcla de tetroles

[pg]	Volumen T-I (μL)	Volumen T-II (μL)	Suma (μL)	MetOH 20% (μL)	Volumen final (μL)
1.0	2.87	5.565	8.435	991.565	1000
2.0	5.74	11.129	16.869	983.131	1000
6.0	17.22	33.87	51.09	948.91	1000
10.0	28.7	56.45	85.15	914.85	1000
14.0	40.18	79.03	119.21	880.79	1000

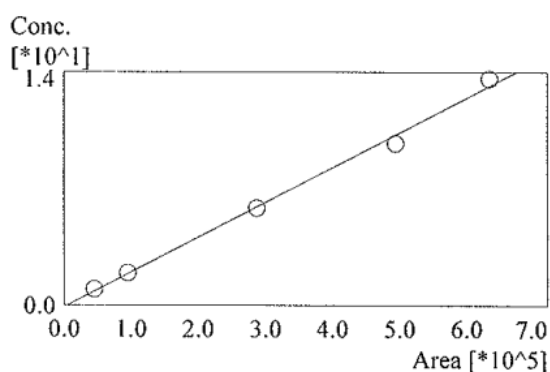
Una vez que los estándares fueron inyectados al cromatógrafo se determinaron los tiempos de retención para T-I y T-II, mismos que no se sobrepone en un corrimiento de la mezcla de ambos (**Tabla 6**).

El tiempo de retención es el tiempo que transcurre desde que la muestra es inyectada hasta que el analito en cuestión alcanza el pico máximo de detección. Los tiempos de retención cromatográficos son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y de una sustancia de referencia puede usarse como un criterio parcial en la construcción de un perfil de identidad (21) siempre y cuando se sigan las mismas condiciones de corrimiento.

Tabla 6. Tiempos de retención para T-I y T-II

Nombre	Tiempo de retención
Tetrol-I	2.8
Tetrol-II	3.8

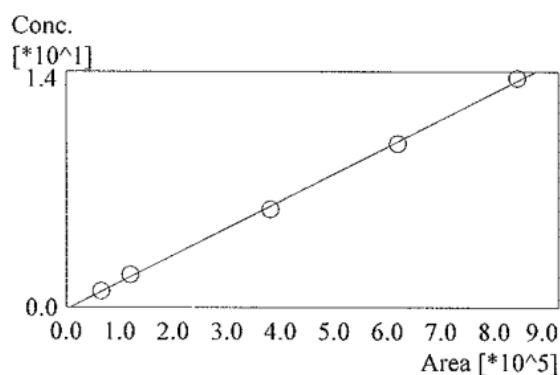
ID# : 1
 Name : Tetrol 1
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=2.15548e-005*x-0.106387$
 Rr1=0.9978808 Rr2=0.9957660
 MeanRF:2.12496e-005 RFSD:7.81934e-007 RFRSD:3.67976
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc. (Ratio)	MeanArea
1	1.000	45424.6
2	2.000	95195.1
3	6.000	287184.1
4	10.000	493721.3
5	14.000	634138.2

Figura 10. Curva de calibración para T-I

ID# : 2
 Name : Tetrol 2
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=1.65451e-005*x-0.122118$
 Rr1=0.9995808 Rr2=0.9991617
 MeanRF:1.60443e-005 RFSD:6.25112e-007 RFRSD:3.89616
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : Detector A



#	Conc. (Ratio)	MeanArea
1	1.000	66029.0
2	2.000	120283.7
3	6.000	381613.3
4	10.000	619889.4
5	14.000	843638.6

Figura 11. Curva de calibración para T-II

Las **figuras 10** y **11** representa la curva de calibración para T-I y T-II, las cuales son proporcionadas por el HPLC, también, el equipo proporciona los cromatogramas correspondientes a la curva (**Ver anexo 5**).

7.6 Análisis de muestras mediante HPLC

Las muestras concentradas (resultantes del Sep Pak) resuspendidas en 100 uL de MetOH al 20% en un vial para HPLC se corrieron a las condiciones marcadas en el punto 7.1.

7.7 Cálculo de la concentración de tetroles / # de nucleótidos

Tomando a consideración el análisis para cálculos de aductos reportado en Alexandrov et.al (3)(4) se realiza el cálculo con las siguientes fórmulas:

$$\frac{\text{Cantidad de tetrol I ó II}}{\text{mg de DNA hidrolizado}} = \frac{\text{pg}}{\text{mg DNA}}$$

$$\frac{\text{pg/mgDNA}}{\text{Peso molecular tetrol I ó II}} = \frac{\text{pmoles}}{\text{mg DNA}}$$

$$\frac{\text{pmoles/ mgDNA}}{\text{Factor}} = 10^6 \text{ aductos DNA}$$

Donde:

Concentración del tetrol I ó II: Proporcionado por el equipo HPLC

Peso molecular de tetrol I: 320 mg/pmol

Peso molecular de tetrol II: 268 mg/pmol

Factor: 3.125

8. Análisis estadístico

Mediante el empleo del software IBM *SPSS statistics*, se realizó el cálculo de los percentiles de los datos pertenecientes a T-I y T-II para la realización de los histogramas presentados, los gráficos Q-Q plot (Cuantil-cuantil) y los valores de referencia, así como la prueba de normalidad Shapiro-Wilk.

IX. RESULTADOS

En el estudio realizado se analizó una población total de 118 mujeres entre las edades de 18 y 35 años residentes en la CDMX. Estas mujeres están incluidas en la cohorte prenatal “Princesa” reclutadas en el Hospital Materno Infantil Inguarán. Las placentas provenientes de dichas mujeres fueron a término (≥ 37 semanas de gestación).

1. Purificación de DNA de placenta

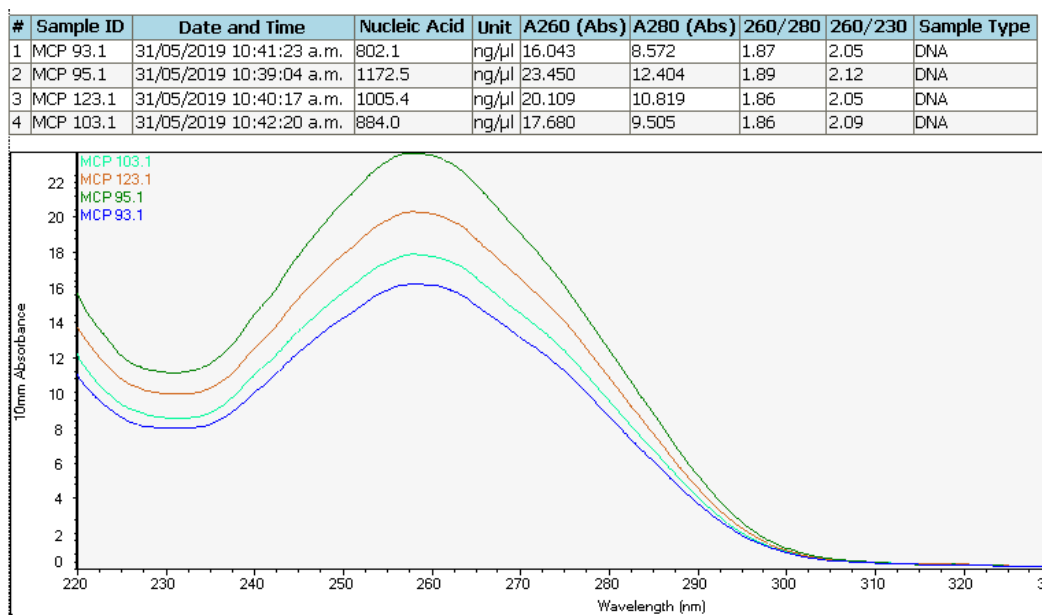


Figura 12. Imagen representativa de la cuantificación de DNA

En la **figura 12** se muestran las concentraciones de DNA, los índices 260/280 y 260/230, así como la imagen del espectro para evaluar la calidad del DNA obtenido. Cabe destacar, que dicha figura es representativa del total de muestras.

La relación 260/280 es usada para evaluar la pureza del DNA y RNA, un valor de 1.8 es aceptado como “puro” para el DNA, si esta relación es más baja, indica la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben a esa longitud de onda, mientras que una relación mayor indica contaminación con RNA (64).

Por otra parte, la relación 260/230 se utiliza como una medida secundaria de la pureza del ácido nucleico. Estos valores a menudo son más altos de los del índice 260/280, por esto los valores esperados se encuentran en el rango de 2.0 – 2.2, si la relación es apreciablemente más baja estaría indicando la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm (64).

2. Determinación de aductos

Una vez hidrolizado el DNA, purificados y concentrados los tetroles, se analizaron en el HPCL arrojando los siguientes datos:

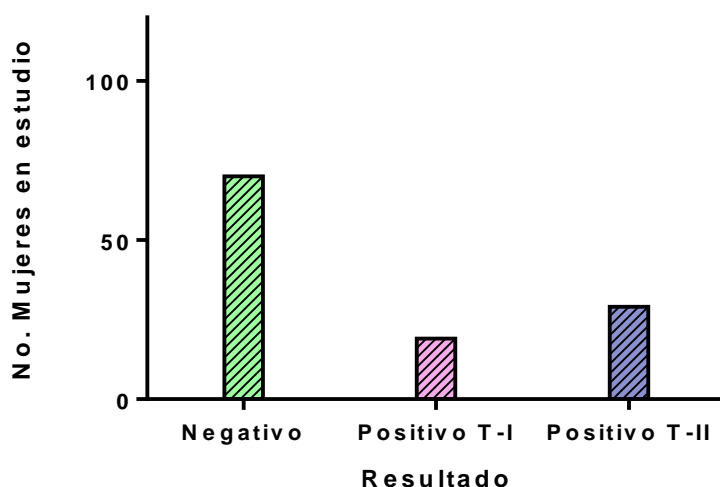


Figura 13. Resultados sobre la presencia de tetroles obtenidos en el HPLC

En la **figura 13** se muestra la frecuencia de la presencia de tetroles producidos en el DNA de placenta, a partir del total de las muestras corridas en el HPLC, la barra en color verde representa a las 83 pacientes en cuyo DNA no se detectaron los tetroles I y II; la barra correspondiente al color rosa representa a las 18 pacientes con aductos producidos por el T-I, por último, la barra en color azul representa a las 28 pacientes con presencia de aductos producidos por el T-II.

Tabla 7. Concentraciones de T-I y T-II determinadas por HPLC

ID	Concentración de t-I [mg/L]	Concentración de t-II [mg/L]	ID	Concentración de t-I [mg/L]	Concentración de t-II [mg/L]	ID	Concentración de t-I [mg/L]	Concentración de t-II [mg/L]
P1	N	N	P40	N	32.2759	P79	N	N
P2	N	88.018	P41	N	N	P80	N	N
P3	N	19.027	P42	0.319	0.25041	P81	N	N
P4	0.62	0.129	P43	N	0.19021	P82	N	N
P5	N	8.94064	P44	N	N	P83	N	N
P6	N	N	P45	0.7894	N	P84	N	N
P7	N	N	P46	0.3256	N	P85	N	N
P8	N	N	P47	N	68.21585	P86	N	N
P9	N	76.40948	P48	N	0.4471	P87	N	N
P10	N	N	P49	1027	N	P88	N	N
P11	N	N	P50	0.956	N	P89	N	N
P12	N	N	P51	N	0.3645	P90	N	N
P13	N	N	P52	N	N	P91	N	N
P14	N	N	P53	N	N	P92	N	N
P15	N	1.074	P54	N	N	P93	N	N
P16	N	N	P55	N	0.21741	P94	N	N
P17	N	N	P56	N	N	P95	N	N
P18	N	N	P57	N	N	P96	N	N
P19	N	N	P58	2.518	0.158	P97	N	N
P20	N	N	P59	N	47.36974	P98	N	N
P21	N	0.17056	P60	0.6536	N	P99	N	N
P22	0.949	0.2409	P61	0.3388	0.292	P100	N	N
P23	N	0.08731	P62	N	N	P101	N	N
P24	N	N	P63	N	N	P102	N	N
P25	N	N	P64	N	N	P103	N	N
P26	N	N	P65	N	N	P104	N	N
P27	N	N	P66	N	N	P105	N	N
P28	0.5	0.138	P67	N	N	P106	N	N
P29	0.65	0.076	P68	N	N	P107	N	N
P30	N	N	P69	N	N	P108	N	N
P31	0.572	0.1642	P70	N	N	P109	N	N
P32	0.21	0.222	P71	N	N	P110	N	N
P33	0.553	0.014	P72	N	N	P111	N	N
P34	0.2553	N	P73	N	N	P112	N	N
P35	N	0.07	P74	N	N	P113	N	N
P36	0.164	N	P75	N	N	P114	N	N
P37	N	35.09625	P76	N	N	P115	N	0.115
P38	N	N	P77	0.297	N	P116	N	N
P39	N	N	P78	N	N	P117	N	0.055
						P118	N	N

N: Negativo a la presencia de tetrol-I y/o tetrol-II

A partir de las muestras de DNA de pacientes, identificadas como positivas ya sea a T-I y/o T-II señaladas en la **tabla 7**, se calculó la cantidad de aductos por cada 100 millones (10^8) de nucleótidos (**tabla 8**) como se indica en el punto **7.7** del apartado **VIII**.

Tabla 8. Número de aductos producidos por T-I y T-II

No.	Aductos T-I /10⁸ nucleótidos	No.	Aductos T-II/10⁸ nucleótidos
1	0.01488	1	0.00229
2	0.0169	2	0.00438
3	0.0194	3	0.00655
4	0.0205	4	0.008266
5	0.02479	5	0.01251
6	0.0293	6	0.01435
7	0.0322	7	0.02495
8	0.03469	8	0.0257
9	0.0757	9	0.02855
10	0.0838	10	0.031
11	0.1199	11	0.0328
12	0.12	12	0.0437
13	0.1407	13	0.0463
14	0.185	14	0.0634
15	0.2045	15	0.0686
16	0.2441	16	0.0786
17	0.333	17	0.2578
18	0.486	18	0.4495
		19	0.997
		20	1.211
		21	10.24
		22	14.823
		23	14.9954
		24	17.83
		25	21.03
		26	23.83
		27	25.2936
		28	30.3117

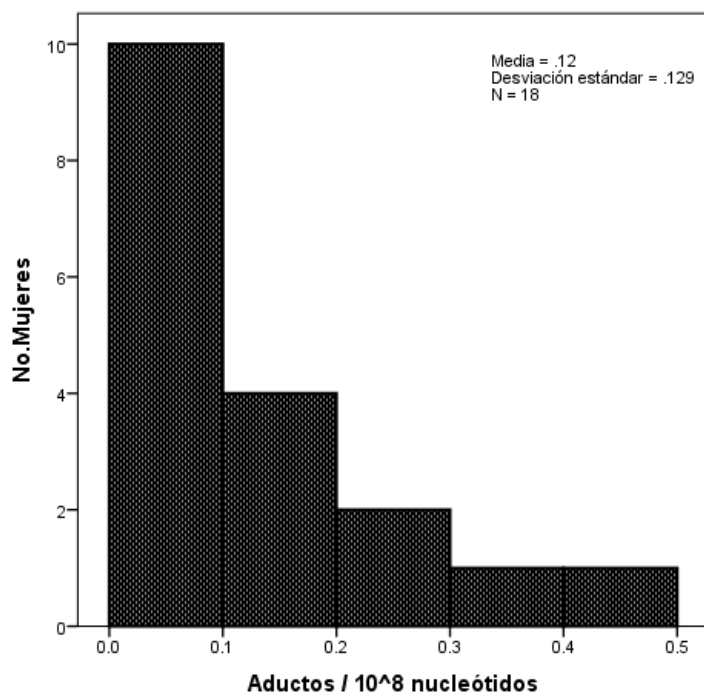


Figura 14. Aductos/ 10⁸ nucleótidos detectados por T-I en placenta

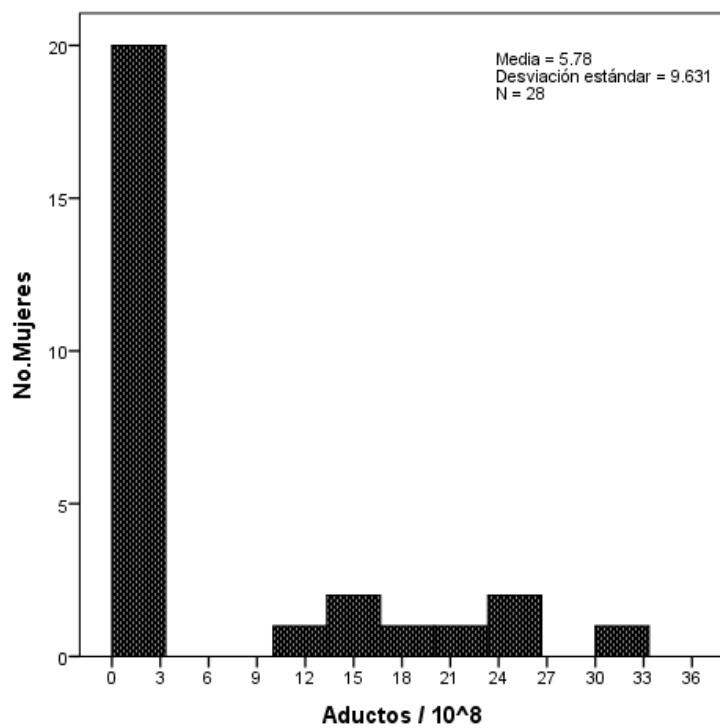


Figura 15. Aductos/ 10⁸ nucleótidos detectados por T-II en placenta

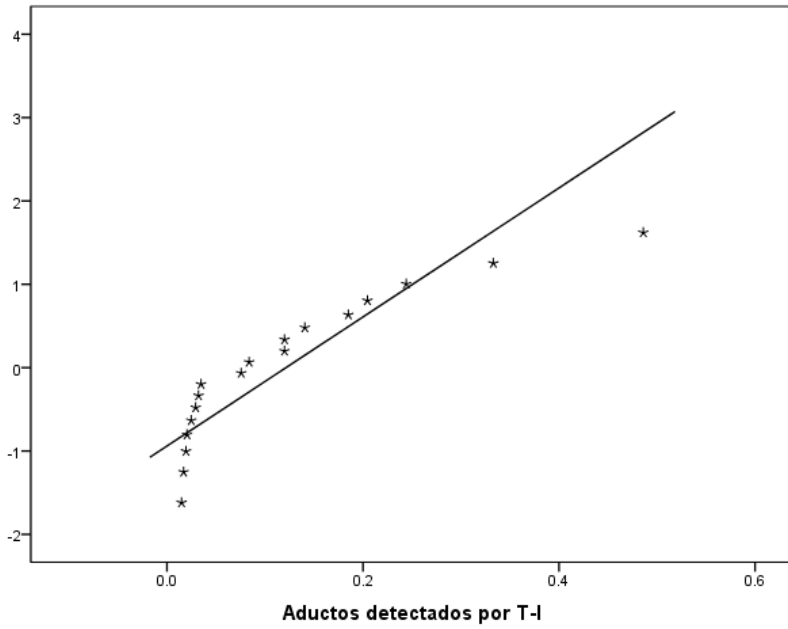


Figura 16. Distribución de los valores de aductos detectados por T-I en placenta

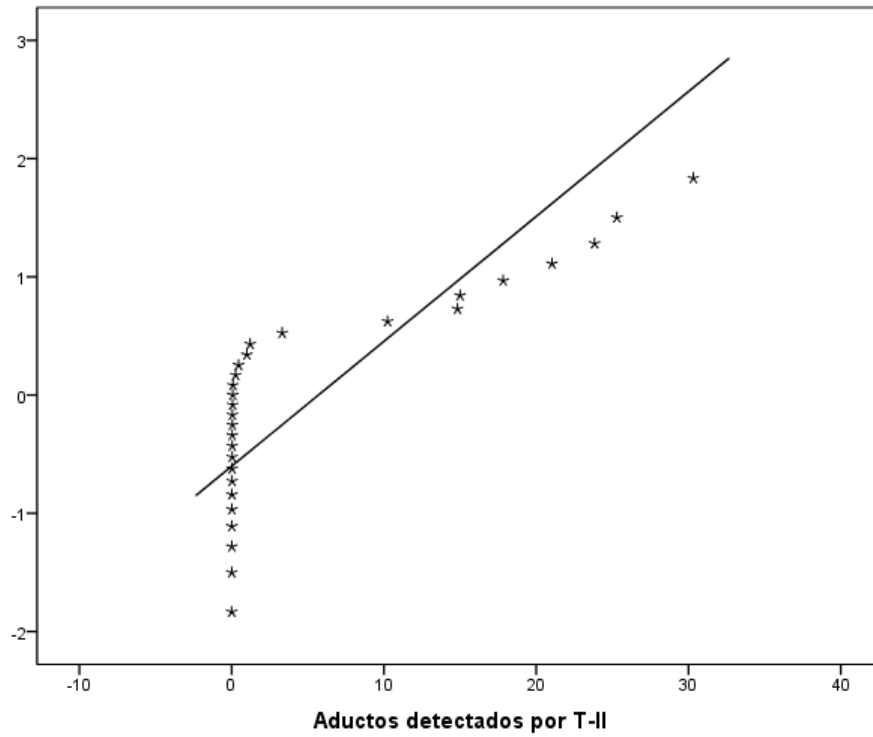


Figura 17. Distribución de los valores de aductos detectados por T-II en placenta

Tabla 9. Prueba de normalidad para datos de T-I y T-II

Prueba	Shapiro-Wilk
Tetrol-I	Significancia
	<0.5
Tetrol-II	<0.5

Nota: El valor de significancia resulta $p < 0.5$, la serie de datos no pasa la prueba y no se considera una distribución normal.

Al evaluar las distribuciones de las **figuras 16** y **17**, el comportamiento de los datos es diverso, por consiguiente, su comportamiento no se lleva a cabo de manera “Gaussiana” (**tabla 9**), lo cual impide utilizar métodos paramétricos para la determinación de valores de referencia. Por consiguiente, se calculan valores de referencia (**Figura 18**) tomando en cuenta el percentil 90.

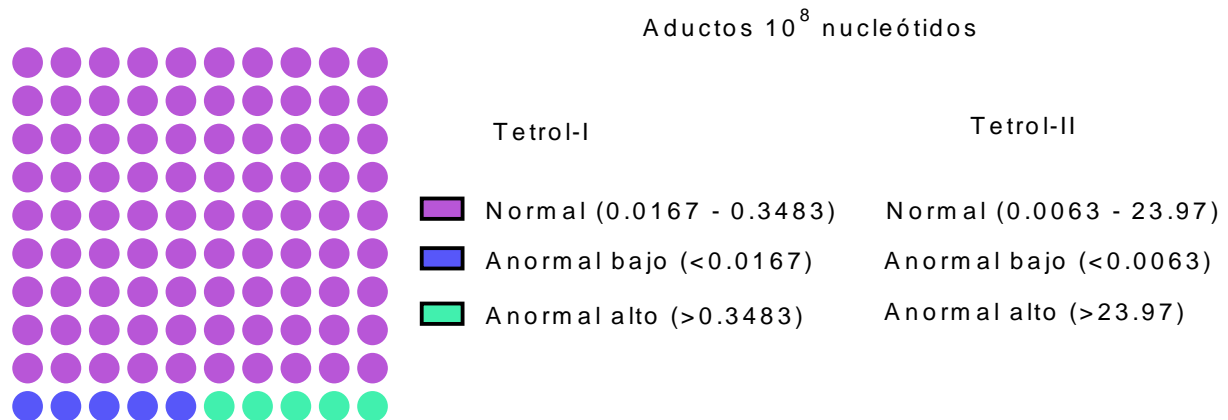


Figura 18. Distribución de las mujeres positivas a T-I y T-II de acuerdo con los valores calculados

3. Localización geográfica de las mujeres

Adicionalmente, se recolectaron las direcciones de las participantes, esto con la finalidad de observar si existe alguna coincidencia con los sitios de residencia de éstas, las cuales se muestran a continuación en la **figura 19**:

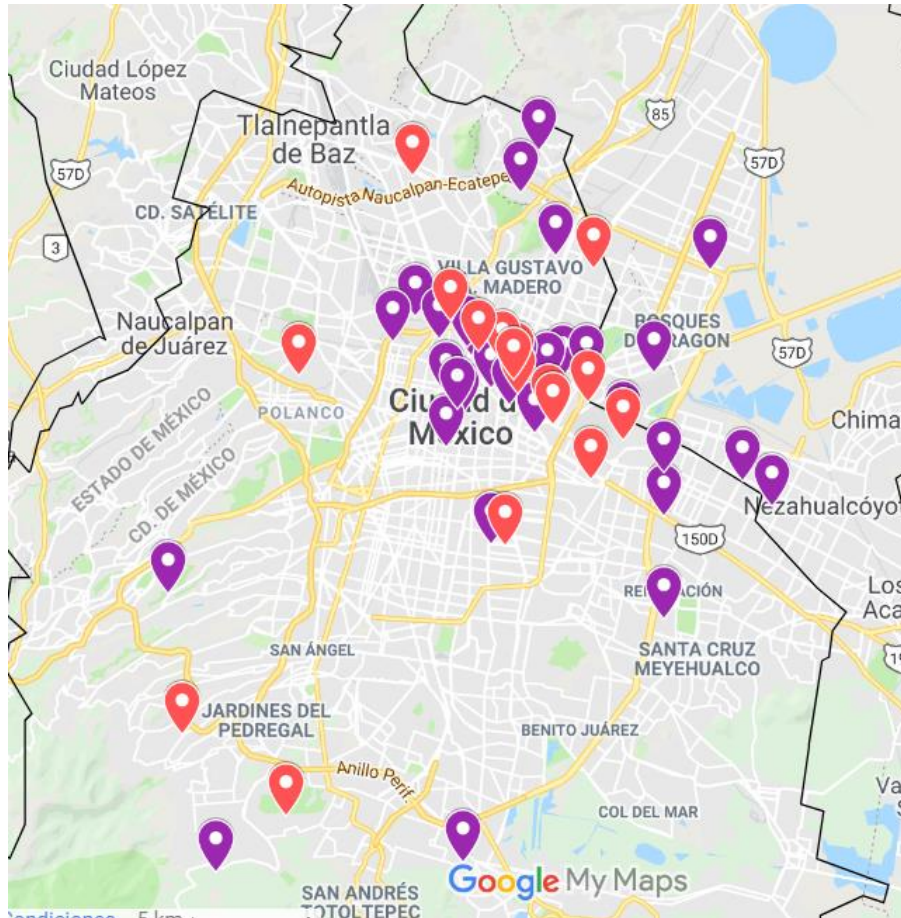


Figura 19. Localización geográfica de las mujeres participantes

En el mapa se muestran las mujeres referidas como positivas con distintivos de color naranja, y aquéllas con resultado negativo con distintivos de color morado. La distribución de los puntos marcados no sigue un patrón específico, es decir, las pacientes positivas y/o negativas no se encuentran reunidas en un sitio específico, no obstante, en su mayoría se encuentran localizadas al norte de la CDMX.

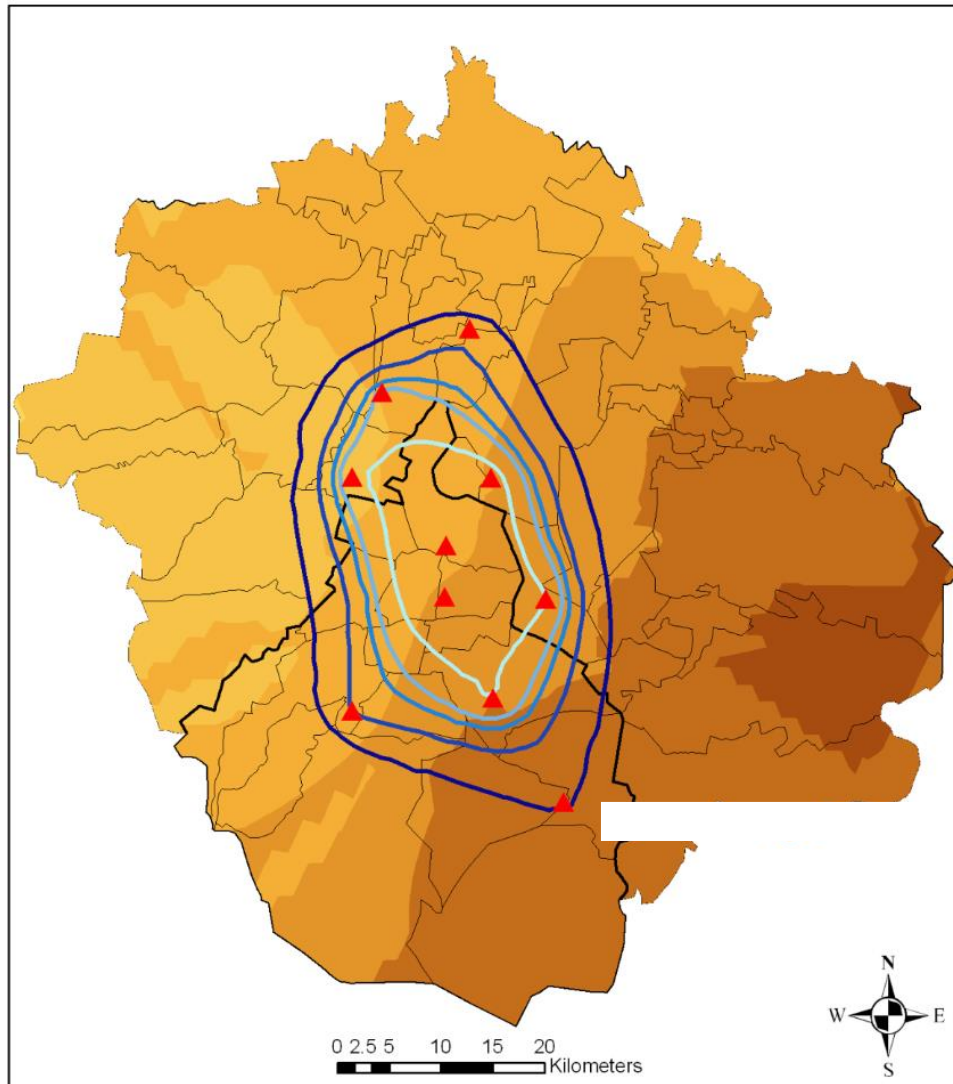


Figura 20. Concentraciones promedio de PM_{10} durante los meses de enero, febrero y marzo en el año 2015 (68).

Para complementar, el mapa señalado (**figura 19**) se comparó con el mapa elaborado por Vadillo y cols (68), en el cual se evaluaron las concentraciones de algunos contaminantes en la CDMX, dentro de los cuales se incluyen a las PM_{10} . En la **figura 20** se observan las zonas con mayor contaminación por este tipo de contaminante, entre más oscuro sea el color presente, más contaminado está, dichas determinaciones se realizaron a partir de los datos proporcionados por los monitores (distintivos rojos) ubicados en distintos puntos del área metropolitana.

X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los problemas de salud asociados a la contaminación ambiental son un tema de interés global, algunos de ellos han sido estudiados con mayor profundidad, destacando su importancia en la práctica de la medicina preventiva. Sin embargo, se tiene un conocimiento escaso sobre su impacto durante y después del embarazo, dichos problemas forman parte de un conjunto de factores que pueden incrementar el riesgo de parto pretérmino y de bajo peso al nacer, a través de procesos relacionados con fenómenos inflamatorios, estrés oxidativo, trastornos endócrinos y transporte deficiente de oxígeno a través de la placenta. Desde hace algún tiempo (67) se ha tratado de establecer la relación entre diversos contaminantes con estos factores y con complicaciones crónicas, las cuales repercuten tanto, en la salud del producto como, en el sector productivo.

La heterogeneidad en el nivel socioeconómico de las poblaciones supone el principal problema al que se enfrenta el desarrollo de una investigación adecuada. Por ello es necesario realizar la determinación de la presencia de estos contaminantes, evaluar y, buscar su posible correlación con los problemas de salud durante el embarazo y posteriores al parto.

La CDMX posee niveles de contaminación a los cuales la población se encuentra expuesta y que se sabe, son considerablemente altos. Durante el embarazo, las mujeres están en contacto con mezclas complejas de compuestos presentes en el ambiente que les rodea cotidianamente, tales como el humo del tabaco y emisiones arrojadas al ambiente como las PM, que a su vez están compuestas de PAH.

Entre estos compuestos se encuentra el B[a]P que da lugar a la formación de múltiples aductos en el DNA, que pueden ser empleados para evaluar la exposición a PAH, reflejando el impacto de la exposición crónica, capacidad de reparación del DNA y como biomarcador del riesgo de padecer cáncer.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el análisis del DNA de las mujeres participantes, los aductos formados por BPDE-DNA de T-I y T-II por cada 10^8 nucleótidos, fueron los siguientes: para el primer tetrol (T-I), con $0 < 0.1$ (10 pacientes), > 0.1 y ≤ 0.2 (4 pacientes), > 0.2 y ≤ 0.3 (2 pacientes), > 0.3 y ≤ 0.4 (1 paciente) y > 0.4 y ≤ 0.5 (1 paciente), observando que más de la mitad de las muestras analizadas están por abajo de los 0.1 aductos/

10^8 (**Figura 14**). Respecto a los BPDE-DNA con T-II, la mayor parte de las muestras (20 pacientes) tienen <3 , el resto de ellas tienen valores de aductos entre 9 y 27 (7 pacientes) y sólo una >30 aductos 10^8 nucleótidos (**Figura 15**).

Es posible comparar estos resultados con valores reportados con anterioridad por otros autores; Topinka y colaboradores (65) reportaron un rango de 0.04 - 3.65 aductos/ 10^8 nucleótidos en el DNA de placenta de un grupo de mujeres residentes cerca de zonas industriales en Teplice, República checa, mientras que Sanyal y cols (59) demostraron 1.04 aductos/ 10^8 nucleótidos también en DNA de placenta pero, en este caso, proveniente de mujeres expuestas pasivamente al humo del cigarro en Connecticut, Estados Unidos. Para poder realizar una comparación adecuada se determinaron valores de referencia (VR) a partir de nuestros datos, obteniendo que, para T-I el VR está en un rango de 0.016 - 0.348 y para T-II este valor oscila entre 0.0063 - 23.97 (**Figura 18**).

Existen otros estudios realizados en placenta, sin embargo, la formación de aductos está relacionada con otros tipos de compuestos químicos o con mujeres que fueron fumadoras antes o durante su embarazo. Así mismo, se tiene registro de estudios en sujetos fumadores a corto y a largo plazo en donde los valores reportados en tejido de pulmón son: fumadores con cáncer de pulmón 11 ± 8.4 (53), 10 ± 7.9 (56), 11.2 ± 7.8 (29) y 3.2 ± 0.4 (9); Fumadores sin cáncer de pulmón 73 ± 5.1 (20), 16 ± 8.5 (17), 25 ± 4.8 (79), 55.05 (35); no fumadores 17 ± 4.5 (20), 6.8 ± 2.9 (79), 1.4 ± 1 (35) aductos por cada 10^8 nucleótidos. Se ha indicado que el incremento de los aductos en DNA son un indicador de riesgo para padecer cáncer de pulmón, como consecuencia del alto consumo del tabaco, por lo que estos hallazgos apoyan la asociación del cáncer de pulmón con el hábito de fumar ya que los valores de aductos se ven incrementados de manera considerable. Es posible que el VR para T-II calculado para nuestros datos abarque algunos de los datos reportados para fumadores, esto no indica que la cantidad de aductos determinada en las mujeres embarazadas sean mayor que la de sujetos fumadores.

En nuestro estudio, como se pudo observar en la mayoría de los datos reportados, la cantidad de aductos presentes en el DNA placentario, se encuentran por debajo de los datos publicados antes mencionados, no obstante, esto no implica que nuestros resultados tengan que ser semejantes. Las causas que pudieran explicar este resultado, en general son diversas, en primer lugar, la ubicación geográfica, las características étnicas y el estilo de vida de los

participantes, mismos parámetros que se pueden aplicar a las mujeres embarazadas, incluyendo el hecho de que habiten en sitios cercanos o no, de las diversas plantas industriales, la convivencia diaria con fumadores activos y las diferentes prácticas de cocción de sus alimentos, además, si en la zona de residencia existen reportes de alta contaminación por PM₁₀, inclusive, si practicaron, sin haberlo reportado, el tabaquismo durante el embarazo.

Adicionalmente se realizó la localización geográfica de las pacientes (**Figura 19**), la cual no muestra un patrón específico, ni para las muestras de DNA positivas, como para las negativas, es decir, se esperaría que las pacientes positivas se estuvieran en la misma zona y alejadas de las negativas, generando una señal del grado de contaminación. Sin embargo, se puede ver que al norte de la CDMX predominan casi la totalidad de las muestras, por lo cual se cotejó con el mapa reportado por Vadillo y cols (68) y, al realizar la comparación con la zona en la cual se encuentran la mayor cantidad de pacientes con BPDE-DNA positivo, es posible observar que no coincide con los sitios más contaminados por PM₁₀ (sitios más oscuros). Tomando en cuenta lo anterior, no podría asegurarse que la presencia de aductos esté relacionada por completo como resultado de la alta contaminación detectada diariamente en la CDMX, por lo que se debe considerar que la cantidad de aductos puede ser influenciada por los factores antes mencionados.

A pesar de ello, existe una variable con la cual se encontraría una asociación más específica respecto a los valores de aductos obtenidos, la cual es la presencia de los polimorfismos de una gran variedad de genes, que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo de los XB. La identificación de estos polimorfismos se ha convertido en una práctica común para establecer relaciones con el daño genotóxico resultante de exposiciones específicas a agentes químicos (50).

Anteriormente, en el apartado 2.2 se mencionó que en el metabolismo del B[a]P participan enzimas que involucran a la familia de mono-oxigenasa como las que conforman las diferentes isoformas del citocromo (CYP450) y a la GST principalmente. El CYP1A1 es la enzima humana más activa entre los CYP para metabolizar pro-carcinógenos, en particular los PAH. La actividad de las enzimas pertenecientes a este grupo involucra el consumo de NADPH tanto en presencia, como en ausencia de sustratos y, la subsecuente producción de ROS (78) que, en dosis moderadas, regulan funciones fisiológicas normales como la progresión del ciclo celular, la

proliferación, diferenciación y migración, participan en la activación de diversas vías de señalización, como la de la proteína supresora de tumores p53, siendo esta última una importante participante en la inducción de apoptosis, necrosis y autofagia (55).

Por otra parte, la GST es la enzima principal de la fase II del metabolismo de los XB y se localiza principalmente en el citosol, que cataliza la conjugación de sustratos al glutatión, además de llevar a cabo otras funciones, participa tanto la eliminación de ROS, como la regeneración de proteínas tioladas (ambas resultantes del estrés oxidativo), incluyendo, su participación en la catálisis de la conjugación con ligandos endógenos y de reacciones en las vías metabólicas no asociadas con la desintoxicación (62).

La expresión y función de estas enzimas dependerá de las variantes polimórficas (isoformas) del gen que las codifica. En algunos estudios previos han descrito los siguientes polimorfismos.

Iniciaremos con las características de los polimorfismos descritos para CYP1A1: dos polimorfismos de nucleótido único, el T3801C, caracterizado por una transición de timina a citosina (generando el sitio de restricción Msp-I) (27)(23), y el A4889G el cual resulta de la transición de guanina a adenina (77), que como consecuencia genera el reemplazo de una isoleucina por valina (Ile462Val), cambios que suceden, ambos, en el exón 7, esta mutación produce una mayor inducibilidad del gen después de la exposición a los ligandos del AhR (en este caso el B[a]P); para CYP1A2 se conocen varios, sin embargo, los más estudiados han sido G3858A y A164C (57)(39) donde al aumentar la actividad de dichas enzimas, se incrementa la producción de ROS que, a su vez, influirá en el equilibrio entre la activación y la desintoxicación metabólicas, ya que la generación de ROS en exceso conlleva al estrés oxidativo celular; con el consecuente daño a proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, entre otros (55) y, por último, hace susceptible al individuo a desarrollar cáncer.

Por otra parte, la neutralización de los BPDE se realiza principalmente por acción de la GST, para esta enzima existen tres isoformas principales μ (GSTM1), θ (GSTT1) y π (GSTP1), en las cuales se han identificado diversos polimorfismos; se han hallado alelos nulos para GSTM1 y GSTT1, (40) (44), también existe una transición en la isoenzima GSTP1, la A313G que a su vez genera un cambio Ile105Val (74) (18). La presencia o ausencia de la actividad enzimática es de importancia crítica, debido a que su presencia le confiere a la célula un tipo de resistencia a sustancias endógenas y/o exógenas como las ROS. Las diferentes especies generadas en los

procesos de desintoxicación por estas variantes pueden dar lugar a una marcada variación en la susceptibilidad a las sustancias nocivas.

Actualmente, en México se ha estudiado muy poco en placenta acerca de la presencia de aductos. En el 2007, Montero y cols (45) evaluaron en población mexicana la frecuencia de los polimorfismos para CYP1A1 y GST mismas que al comparar con otras etnias (caucásicos, asiáticos, africanos o afroamericanos) detectaron que: la variante CYP1A1 Ile462Val está aumentada, con respecto al alelo nulo de la isoenzima GSTM1 no se encontraron diferencias, mientras que el alelo nulo de GSTT1 presentó una frecuencia menor en comparación con otras poblaciones. Cuando se habla de un alelo nulo se indica la ausencia de un determinado fenotipo, en este caso, significaría la ausencia de la actividad de la GSTT1, sin embargo, si la frecuencia de la ausencia de este alelo es baja y, por lo tanto, la enzima sí se está expresando. Cabe mencionar, que GSTP1 no fue evaluado en el dicho estudio.

Los datos proporcionados por Montero y cols pudieran dar una explicación más amplia para los valores de aductos detectados en el DNA de las mujeres embarazadas. Como se explicó anteriormente, una gran parte de nuestros datos corresponden a una baja frecuencia de aductos, sabiendo que en la población mexicana la actividad del CYP1A1 en el metabolismo del B[a]P en la placenta, está incrementada, lo que implicaría una gran cantidad de aductos de BPDE-DNA. Sin embargo, como sabemos, es necesaria la intervención de las enzimas de fase II, principalmente la GST para que los productos de la CYP sean eliminados. Entonces, si el alelo nulo de la isoenzima GSTT1 disminuye, aumenta tanto la presencia, como la actividad de la enzima, permitiendo que los BPDE sean convertidos en moléculas más polares y con esto que puedan ser eliminados del organismo, disminuyendo la posibilidad de que éstas formen aductos con el DNA. De esta manera, se esperaría que la cantidad de aductos fuera baja, dato que se puede corroborar en las tablas 6 y 7.

Aunado a esto, es importante considerar que el metabolismo de los XB en la placenta es crítico, particularmente en el primer trimestre del embarazo, mientras que la actividad de las enzimas del CYP disminuye en el segundo y tercer trimestre (46). Además, para el caso específico del B[a]P, se ha visto que la isoenzima GSTP1 que contienen Val105 tienen una eficacia 7 veces mayor para los PAH que las enzimas que contienen Ile105 (32), desafortunadamente, en el estudio de Montero (45), esta isoenzima no fue evaluada.

Debido a esto, este trabajo genera una interrogante ¿Existe una relación entre los niveles de aductos presentes en el DNA de placenta de mujeres residentes en zonas contaminadas de la CDMX con los polimorfismos de las enzimas y/o receptores que participan en el metabolismo de PAH? Para dar una respuesta se propone que, a partir del DNA extraído de la placenta, se lleve a cabo la genotipificación mediante PCR para la identificación de los polimorfismos presentes y así poder relacionar de una manera más contundente los valores obtenidos en las futuras muestras estudiadas. De esta manera, permitirá proporcionar una mayor cantidad de datos para conocer si existe una relación entre la presencia de BPDE-DNA con resultados adversos al nacimiento, así como el riesgo tanto en las mujeres como en el hijo de desarrollar un proceso de carcinogénesis.

Por otra parte, también es necesario dar el seguimiento de los neonatos para poder establecer una posible correlación entre la presencia de aductos y su efecto en los mismos.

XI. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de aductos BPDE-DNA en tejido placentario, no obstante, de acuerdo a los índices diarios de contaminación registrados en la CDMX, se hubiera esperado que la proporción de mujeres positivas a la formación de dichos aductos, así como las cantidades obtenidas hubiera sido mayor. El hecho de que la CDMX esté catalogada como una ciudad contaminada y se hayan obtenido niveles bajos de aductos no indica que no exista una correlación sobre su formación, por lo cual, es necesario considerar que puedan estar directamente relacionadas las enzimas y sus diferentes polimorfismos identificados, involucradas en la eliminación de los BPDE del organismo de las mujeres gestantes.

XII. REFERENCIAS

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (2016). *Resúmenes de Salud Pública. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)*. Recuperado el 22 de Enero de 2019, de https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs69.html
2. Agudo, A. (2010). *Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)*. Madrid, España: Process Printed S.L.
3. Alexandrov, K., Rojas, M., Geneste, O., Castegnaro, M., Camus, A.-M., Petruzzelli, S., Bartsch, H. (1992). An improved fluourometric Assay for Dosimetry of benzo[a]pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Research*, 15, 6248-6253.
4. Alexandrov, K., Rojas, M., Kadlubar, F. F., Lang, N. P., & Bartsch, H. (1996). Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis*, 17(9), 2081-2083.
5. An, J., Yin, L., Zhong, Y., Zhang, X., Wu, M., Sheng, G., & Huang, Y. (2011). The combined effects of BDE47 and BaP on oxidatively generated DNA damage in L02 cells and the possible molecular mechanism. *Mutation Research*, 721(2), 192-198.
6. Andersen, M. H., Saber, A. T., Pedersen, J. E., Clausen, P. A., Løhr, M., Kermanizadeh, A., & Loft, S. (2018). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, lung function, systemic inflammation, and genotoxicity in peripheral blood mononuclear cells from firefighters before and after a work shift. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 59(6), 539-548.
7. Andreassen, A., Kure, E. H., Nielsen, P. S., Autrup, H., & Haugen, A. (1996). Comparative synchronous fluorescence spectrophotometry and ³²P-postlabeling analysis of PAH-DNA adducts in human lung and the relationship to TP53 mutations. *Mutations Research*, 368(3), 257-282.
8. Androutsopoulos, V., Tsatsakis, A., & Spandidos, D. A. (2006). Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer*, 9(187), 1-17.
9. Arif, J. M., Dresler, C., Clapper, M. L., Gairola, C. G., Srinivasan, C., Lubet, R. A., & Gupta, R. C. (2006). Lung DNA adducts detected in human smokers are unrelated to typical polyaromatic carcinogens. *Chemical Research in Toxicology*, 19(2), 295-299.
10. Bai, H., Wu, M., Zhang, H., & Tang, G. (2017). Chronic polycyclic aromatic hydrocarbon exposure causes DNA damage and genomic instability in lung epithelial cells. *Oncotarget*, 8(45), 79034-79045.
11. Barouki, R., Aggerbeck, M., & Aggeerbeck, L. (2012). The aryl hydrocarbon receptor system. *Drug Metabolism and Drugs Interactions*, 27(1), 3-8.

12. Boysen, G., & Hecht, S. S. (2003). Analysis of DNA and protein adducts of Benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutation Research*, 543(1), 17-30.
13. Bravo Ferrer, I. (2018). Papel del receptor de hidrocarburos de arilo en el envejecimiento cerebral. *Tesis de doctorado*. España, Universidad Complutense de Madrid.
14. Brown, T. (2002). *Genomes*. Oxford: Wiley-Liss. Estados Unidos
15. Broyde, S., Wang, L., Cai, Y., Jia, L., Shapiro, R., & Patel, D. J. (2011). Covalent polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts: Carcinogenicity, structure, and function. *Current Cancer Disease*, 6, 181-207.
16. Castorena Torres, F., Bermúdez de Leon, M., Cisneros, B., Zapata Pérez, O., Salinas, J. E., & Albores, A. (2008). Changes in gene expression induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in the human cell lines HepG2 and A549. *Toxicology in Vitro*, 22, 411-421.
17. Cheng, Y. W., Chen, C. Y., Lin, P., Huang, K. H., Lin, T. S., Wu, M. H., & Lee, H. (2000). DNA adduct level in lung tissue may act as a risk biomarker of lung cancer. *European Journal of Cancer*, 36(11), 1381-1388.
18. Cotignola, J., Leonardi, D. B., Shahabi, A., Acuña, A. D., Stern, M. C., Navone, N., Vázquez, E. (2011). Glutathione-S-transferase (GST) polymorphisms are associated with relapse after radical prostatectomy. *Prostate Cancer and Prostatic Disease*, 12, 1-7.
19. Dai, X., Deng, S., Wang, T., Qiu, G., Li, J., Yang, B., Ye, J. (2014). Associations between 25 lung cancer risk-related SNPs and polycyclic aromatic hydrocarbon-induced genetic damage in coke oven workers. 23(6), 986-996.
20. Dunn, B. P., Vedal, S., San, R. H., Kwan, W. F., Nelems, B., Enarson, D. A., & Stich, H. F. (1991). DNA adducts in bronchial biopsies. *International Journal of Cancer*, 48(4), 4485-492.
21. Esquivel Soto, E., & Leal Guadarrama, L. I. (2004, Junio). Cromatografía de fase reversa. Cuernavaca, Morelos, México. Retrieved from http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_fase_reversa.pdf
22. Ewa, B., & Danuta, M. Š. (2017). Polycyclic aromatic hydrocabons and PAH-related DNA adducts. *Human Genetics*, 58(1), 321-330.
23. Ezzeldin, N., El-Lebedy, D., Darwish, A., El-Bastawisy, A., Hassan, M., El-Aziz, S. A., Saad-Hussein, A. (2017). Genetic polymorphism of human cytochrome P450 CYP1A1 in an Egyptian population and tobacco-induced lung cáncer. *Genes and Environmental Research*, 39(7), 1-8.
24. Flower-Geary, L., & Harvey, R. G. (1993). Cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbonso-quinones in rat and human hepatoma cells. *Chemical Research in Toxicology*, 6(3), 252-260.

25. Franco Tobón, Y. N., & Ramírez Botero, C. M. (2013). El benzo(a)pireno en los alimentos y su relación con el cáncer. *Escuela de Nutrición y Dietética*, 15(1), 99-112.
26. Fu, M., Zheng, F., Xu, X., & Niu, L. (2011). Advances of study on monitoring and evaluation of PM2.5 pollutions. *Meteorology and Disaster Reduction Research*, 34, 1-6.
27. Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A. K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J. L., Bathum, L. (2001). Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiological Biomarkers*, 10(12), 1239-1248.
28. Gaskill, S. J., & Bruce, E. D. (2016). Binary Mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Display Nonadditive Mixture Interactions in an In Vitro Liver Cell Model. *Risk Analysis*, 36(5), 968-991.
29. Godschalk, R., Nair, J., Van Schooten, F. J., Risch, A., Drings, P., Kayser, K., Bartsch, H. (2002). Comparison of multiple DNA adduct types in tumor adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis*, 23(12), 2081-2086.
30. Godschalk, R., Van Schooten, F.-J., & Bartsch, H. (2003). A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 36(1), 1-11.
31. Guaita, R., Pichiule, M., Maté, T., Linares, C., & Día, J. (2011). Short-term impact of particulate matter (PM2.5) on respiratory mortality in Madrid. *International Journal of Environmental Health Research*, 21(1), 260-274.
32. Hayes, J. D., & Strange, R. C. (2000). Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61, 154-166.
33. Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374.
34. Hsu, G. W., Huang, X., Lunevas, N. P., Geacintov, N. E., & Beese, L. S. (2005). Structure of a high fidelity DNA polymerase bound to a benzo[a]pyrene adduct that blocks replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3764-3770.
35. Izzotti, A., Pulliero, A., Puntoni, R., Peluso, M., Filiberti, R., Munnia, A., Merlo, D. F. (2010). Duration of exposure to environmental carcinogens affects DNA-adduct level in human lymphocytes. *Biomarkers*, 15(7), 575-582.
36. Johansson, C., Norman, M. G., & Gidhagen, L. (2007). Spatial & temporal variations of PM10 and particle number concentrations in urban air. *Environmental Monitoring and Assessment*, 27(3), 477-487.
37. Karttunen, V., Myllynen, P., Prochazka, G., Pelkonen Pelkonen, O., Segerbäck, D., & Vähäkangas, K. (2010). Placental transfer and DNA binding of benzo(a)pyrene in human placental perfusion. *Toxicology Letters*, 197(1), 75-81.

38. Knuckles, M. E., Inyang, F., & Ramesh, A. (2001). Acute and subchronic oral toxicities of benzo[a]pyrene in F-344 rats. *Toxicological Sciences*, 61, 382-388.
39. Koonrungsomboon, N., Khatsri, R., Wongchompoo, P., & Teekachunhatean, S. (2017). The impact of genetic polymorphisms on CYP1A2 activity in humans: a systematic review and meta-analysis. *The Pharmacogenomics Journal*, 18(6), 760-768.
40. Kuljukka Rabb, T., Nylund, L., Vaaranrinta, R., Savela, K., Mutanen, P., Veidebaum, T., Peltonen, K. (2002). The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, 12(1), 81-91.
41. Lin, N., Mu, X. L., Wang, G. L., Ren, Y. A., Tang, L., Wang, B., Tao, S. (2017). A Genetic Susceptibility Study of Lung Cancer Risk Potentially Associated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Inhalation Exposure. *Biomedical and Environmental Sciences*, 30(10), 772-776.
42. Malviya, R., Bansal, V., Prakash Pal, O., & Kumar Sharma, P. (2009). High Performance Liquid Chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), 22-26.
43. Matter, B., Wang, G., Jones, R., & Tretyakova, N. (2004). Formation of diastereomeric Benzo(a)pyrene diol-Epoxy-Guanine adducts in P53 gene-driven DNA sequences. *Chemical Research in Toxicology*, 17(1), 731-741.
44. McCarty, K. M., Santella, R. M., Steck, S. E., Cleveland, R. J., Ahn, J., Ambrosone, C. B., Eng, S. M. (2009). PAH-DNA adducts, cigarette smoking, GST polymorphisms, and breast cancer risk. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 552-558.
45. Montero, R., Araujo, A., Carranza, P., Mejía Loza, V., Serrano, L., Albores, A., Camacho Carranza, R. (2007). Genotype Frequencies of Polymorphic GSTM1, GSTT1, and Cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Human Biology*, 79(3), 299-312.
46. Myllynen, P., Pasanen, M., & Vähäkangas, K. (2007). The fate and effects of xenobiotics in human placenta. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 3(1), 331-346.
47. NOM-025-SSA1-2014, (2014). *Salud ambiental. Valores límite permisibles para la concentración de partículas suspendidas PM10 y PM2.5 en el aire ambiente y criterios para su evaluación*. México.
48. Nováková, L., Svoboda, P., & Pavlík, J. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography. Liquid Chromatography. In S. Fanali, P. R. Haddad, & M. L. Riekkola, *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation* (pp. 719-769). United States: Elsevier.
49. Park, J. H., Mangal, D., Tacka, K. A., Quinn, A. M., Harvey, R. G., & Penning, T. M. (2008). Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-

- dihydrodiol activation in human lung A549 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(19), 6846-6851.
50. Pavanello, S., & Clonfero, E. (2000). Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. *Mutation Research*, 463(3), 285-308.
51. Petit, P., Maître, A., Persoons, R., & Bicout, D. J. (2019). Lung cancer risk assessment for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in various industries. *Environment International*, 124, 109-120.
52. Phillips, D. H., Farmer, P. B., Beland, F. A., Nath, R. G., Poirier, M. C., Reddy, M. V., & Turteltaub, K. W. (2000). Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(1), 222-233.
53. Phillips, D. H., Hewer, A., Martin, C. N., Garner, R. C., & King, M. M. (1988). Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking. *Nature*, 336(6201), 790-792.
54. Randerath, K., Randerath, E., Danna, T. F., Van Golen, L., & Putman, K. L. (1996). A new sensitive ³²P-postlabeling assay based on the specific enzymatic conversion of bulky DNA lesions to radiolabeled dinucleotides and nucleoside 5'-monophosphates. *Carcinogenesis*, 10(7), 1231-1239.
55. Redza Dutordoir, M., & Averill Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863, 2977-2992.
56. Ryberg, D., Hewer, A., Phillips, D. H., & Haugen, A. (1994).). Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients. *Cancer Research*, 54(22), 5801-5803.
57. Sachse, C., Upinder Bhambra, Bhambra, U., Smith, G., Lightfoot, T., Barrett, J. H., Gooderham, N. J. (2003). Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 55(1), 68-76.
58. Sacristán San Cristobal, M., Diaz Peña, E., Alarcón Aguarales, B., Vicente Córdoba, C., & Legaz González, M. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III. Práctica de laboratorio: optimización en la separación de compuestos semejantes mediante modificación de la fase móvi. *Seria Técnicas y Métodos*, 4(3), 48-78.
59. Sanyal, M. K., Mercan, D., Belanger, K., & Santella, R. M. (2007). DNA adducts in human placenta exposed to ambient environment and passive cigarette smoke during pregnancy. *Birth Defects Research*, 79, 289-294.
60. Schärer, O. D. (2013). Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, 1-19.

61. Shami, S. G., Wolff, R. K., Hahn, F. F., Brooks, A. L., & Griffith, W. (1985). Early cytokinetic and morphological response of rat lungs to inhaled benzo(a)pyrene, gallium oxide, and SO₂. *Environmental Research*, 3(1), 12-25.
62. Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members. *Biochemical Journal*, 360, 1-16.
63. Sistema de Monitoreo Atmosférico. (2019). *Dirección de monitoreo atmosférico*. Retrieved from <http://www.aire.cdmx.gob.mx/default.php>
64. ThermoScientific. (2007). *NanoDrop technical support bulletin. 260/280 and 260/230 ratios*. Retrieved mayo 27, 2019, from https://biosci-batzerlab.biology.lsu.edu/Genomics/documentation/3130_NanoDrop_tips.pdf
65. Topinka, J., Binková, B., Mráčková, G., Stávková, Z., Benes, I., Dejmek, J., Srám, R. J. (1997). DNA adducts in human placenta as related to air pollution and to GSTM1 genotype. *Mutation Research*, 390(1), 59-68.
66. United States Environmental Protection Agency. (2017). *Benzo(a)pyrene (BaP). Toxicity and exposure assessment for children's health*. Retrieved from <https://www.epa.gov/>
67. Vadillo Ortega, F., O'Neill, M. S., Vargas Osornio, A., Buxton, M. A., Sánchez, B. N., Rojas Bracho, L., . . . Brown, D. G. (2013). Air pollution, inflammation and preterm birth in Mexico City: study design and methods. *Science of the Total Environment*, 448, 79-83.
68. Vadillo Ortega, F., Rivera González, L. O., Zhang, Z., Sánchez, B. N., Zhang, K., Brown, D. G., O'Neill, M. S. (2015). An assessment of air pollution exposure methods in Mexico City, Mexico. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 65, 581-591.
69. Valananidhis, A., Clachogianni, T., Fiotakis, K., & Loidas, S. (2013). Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10, 3886-3907.
70. Vázquez Gómez, G., Rubio Lightbourn, J., & Espinosa Aguirre, J. J. (2016). Mecanismos de acción del receptor de hidrocarburos de arilos en el metabolismo del benzo[a]pireno y el desarrollo de tumores. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(1), 54-67.
71. Vázquez, G. (2018). Activación del eje AhR/Src/ERK en la inducción del CYP1A1 y genotoxicidad mediada por benzo(a)pireno en células de epitelio pulmonar humano, BEAS-2B. *Tesis de doctorado*. Instituto de Investigaciones Biomédicas: Universidad Nacional Autónoma de México.

72. Villancis, J. (2013). Biorremediación de suelos contaminados con benzo(a)pireno empleando *Pleurotus ostreatus*. *Tesis de maestría*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
73. Vives, I., Grimalt, J., & Guitart, R. (2001). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 3(1), 45-51.
74. Vole, Coles, B. F., & Kadlubar, F. F. (2003). Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs. *Biofactors*, 17(1), 115-130.
75. Wakx, A., NEdder, M., Tomkiewicz-Raulet, C., Dalmasso, J., Chissey, A., Boland, S., Ferecatu, I. (2018). Expression, localization, and activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the human placenta. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 1-27.
76. World Health Organization. (2018). *Air pollution*. Retrieved from WHO global ambient air quality database: <http://www.who.int/airpollution/data/cities/en/>
77. Wu, B., Liu, K., Huang, H., Yuan, J., Yuan, W., Wang, S., Yin, C. (2013). MspI and Ile462Val polymorphisms in CYP1A1 and overall cancer risk: a meta-analysis. *Plos Ones*, 8(12), 1-8.
78. Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199, 316-331.
79. Zhao, C., Georgellis, A., Flato, S., Palmberg, L., Thunberg, E., & Hemminki, K. (1997). DNA adducts in human nasal mucosa and white blood cells from smokers and non-smokers. *Carcinogenesis*, 18(11), 2205-2208.

XIII. ANEXOS

ANEXO 1: FUENTES DE PAH

En general, se puede establecer una clasificación para las fuentes responsables de la presencia de PAH en el medio ambiente.

Fuentes naturales

Algunas formas de combustión natural de materia orgánica que generan estos compuestos son las erupciones de los volcanes y los incendios forestales. Así también, el petróleo y en general los combustibles fósiles contienen de forma natural PAH, pero en una concentración mucho menor (alrededor del 1%), esto dependiendo en gran medida del origen del crudo (72).

Fuentes antropogénicas

Esta clasificación incluye a todas aquellas actividades que generan PAH y son dependientes de la actividad humana.

➤ Emisiones domésticas

Entre este tipo de emisiones podemos incluir, la combustión incompleta de madera y otros combustibles para la calefacción doméstica, tales como gas y otros compuestos orgánicos. También se encuentra asociado a la quema de basura y al humo del tabaco.

Así mismo, se forman como derivados de diferentes prácticas de cocción en el hogar, ejemplo de estos son el ahumado, secado, tostado, horneado, la fritura, y la extracción de aceites.

En la termo degradación de lípidos, como en el caso de los aceites comestibles que se someten a temperaturas elevadas, es importante considerar el método y tiempo de cocción de los alimentos, la fuente de energía utilizada, la proximidad de la misma con el alimento, las altas temperaturas y el tipo de combustible usado (25).

➤ Emisiones de vehículos de motor

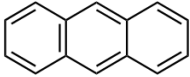
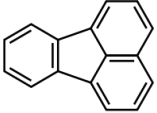
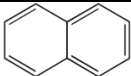
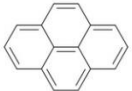
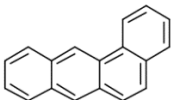
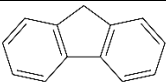
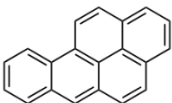
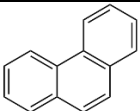
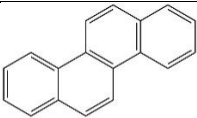
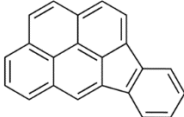
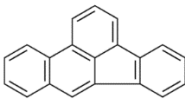
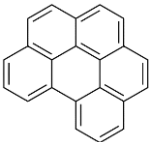
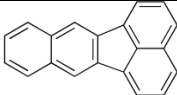
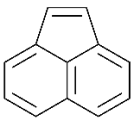
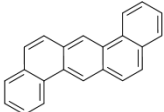
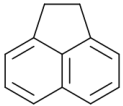
Otra de las fuentes principales de PAH, es la emisión de gases de todo tipo de vehículos, incluyendo barcos y aviones. En las áreas urbanas una de las fuentes principales es la liberación de los gases por los tubos de escape de automóviles y camiones, debido al uso necesario de gasolina y diésel para su funcionamiento diario (2).

➤ Usos industriales

Algunos PAH se utilizan en la producción de medicamentos, tintas, plásticos y pesticidas. También se encuentran en el asfalto, el alquitrán de huella, la brea, y algunos disolventes comerciales. Así mismo, estos compuestos surgen en plantas de generación de energía eléctrica, incineradoras de residuos domésticos y de origen agrícola, y en la industria metalúrgica, especialmente del hierro y el aluminio (2).

ANEXO 2: PAH PRIORITARIOS

Tabla 10. Nombre y estructura química de los dieciséis PAH prioritarios establecidos por la USEPA

Nombre del PAH	Estructura química	Nombre del PAH	Estructura química
Antraceno		Fluoranteno	
Naftaleno		Pireno	
Benzo[a]antraceno		Fluoreno	
Benzo[a]pireno		Fenantreno	
Criseno		Ideno[1, 2, 3-c, d]pireno	
Benzo[b]fluoranteno		Benzo[g,h,i]perileno	
Benzo[k]fluoranteno		Acenaftileno	
Dibenzo[a,h]antraceno		Acenafteno	

ANEXO 3: RECEPTOR DE HIDROCARBUROS DE ARILO

El AhR es un factor de transcripción citoplasmático perteneciente a la familia de los factores de transcripción con dominio bHLH-PAS (*basic helix loop helix*-PER ARNT-SIM). Esta familia de proteínas desempeña un papel importante en diversos procesos celulares como desarrollo de órganos, adaptación a hipoxia, control del ciclo circadiano y en el metabolismo de los XB (11).

El dominio PAS se sitúa en el extremo N-terminal y consiste en una secuencia que se divide en dos regiones altamente conservadas: PAS-A y PAS-B. A través de este dominio pueden darse uniones tanto entre proteínas PAS. El dominio bHLH también se encuentra en la zona amino terminal y consiste en una región básica, adyacente a otra región que forma una estructura tridimensional conocida como hélice-bucle-hélice. A través de la región básica, los factores de transcripción de esta familia se unen a regiones promotoras de los genes diana. Además, el dominio bHLH participa también en la unión a otras proteínas de la misma familia. En la región C-terminal, se sitúan dominios de transactivación o de represión (13).

Los factores de transcripción de tipo bHLH/PAS se caracterizan porque necesitan dimerizar con otras proteínas de tipo PAS para formar un complejo transcripcionalmente activo. Estas proteínas se dividen en dos clases: Clase I (α) y clase II (β). La expresión de las proteínas de la clase I, generalmente está restringida a un tejido o es regulada por una señal y forman heterodímeros sólo con las proteínas de la clase II, mientras que la clase II, es ubicua o su expresión no está sometida a regulación y puede formar homodímeros con proteínas de su misma clase; en el caso de AhR, el dímero lo forma con el Traslocador del Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (ARNT) (25).

Además, AhR puede inducir la expresión de genes cuyas regiones promotoras carecen de la secuencia XRE, como es el caso de la proteína BAX (factor bcl-2 asociado a la proteína X), implicada en la inducción de la apoptosis o el de PON1 (Paraoxonasa 1), una esterasa sérica responsable de la hidrólisis de organofosfatos (13).

ANEXO 4: HPLC

Todas las formas de cromatografía de líquidos son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil.

La cromatografía de líquidos se utilizaba básicamente para separar compuestos polares, siendo la fase estacionaria de un carácter altamente polar y la fase móvil poco polar, posteriormente se introdujo la cromatografía de fase reversa en la cual se utiliza un empaque hidrofóbico y una fase móvil polar.

- **Fase estacionaria**

La fase estacionaria para cromatografía de fase reversa consiste en una matriz porosa e insoluble a la que se le han unido químicamente compuestos hidrofóbicos. En su mayoría, los soportes de las columnas están rellenas de sílica rígida, misma que se encuentra formada por partículas porosas y uniformes, con diámetros de 3.5 o 10 micras (48).

La superficie de la sílica está constituida por grupos silanol (SiOH) químicamente reactivos (**Figura 21**).

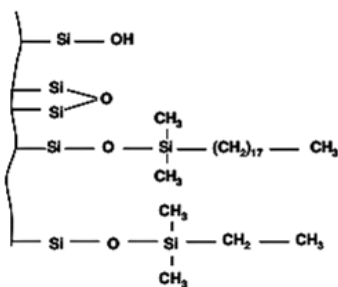


Figura 21. Representación de la estructura química de la sílica. (21).

Cuando un soluto se disuelve en agua, las fuerzas de atracción entre las moléculas de agua se distorsionan o se rompen. Únicamente los solutos altamente polares o iónicos pueden interactuar con la estructura del agua. Los solutos no polares casi no interactúan con estas estructuras y como consecuencia “abandonan” la fase móvil para adsorberse al hidrocarburo de la fase estacionaria (21).

- **Fase móvil**

La retención hidrofóbica del soluto en la fase estacionaria puede disminuirse añadiendo un disolvente orgánico a la fase móvil acuosa; al reducir la polaridad de la fase móvil, la distribución de los solutos se cambia hacia la fase móvil. La cantidad de muestra que se une a la fase estacionaria depende de la concentración del ligando inmovilizado, de las propiedades químicas y físicas de la molécula que va a ser adsorbida y de la polaridad de la fase móvil y estacionaria.

Así, conforme menos polar sea la fase móvil, menor será la adsorción de la muestra a la fase estacionaria (21). La optimización de la fase móvil puede realizarse con dos métodos diferentes:

1. **Método de elución isocrática:** se lleva a cabo con un solo disolvente o con una mezcla de disolventes, constante, en el tiempo de análisis.
2. **Método de elución en gradiente:** Se lleva a cabo variando de forma continua la composición de los disolventes de forma que su fuerza vaya incrementando durante el tiempo de análisis. Normalmente se procede de esta forma, utilizando una fuerza de fase móvil más débil al principio para ir incrementándola después (58).



Figura 22. HPLC UFLC-XR de Shimadzu con detector de RF-10AxI

ANEXO 5: CROMATOGRAMAS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

<Chromatogram>

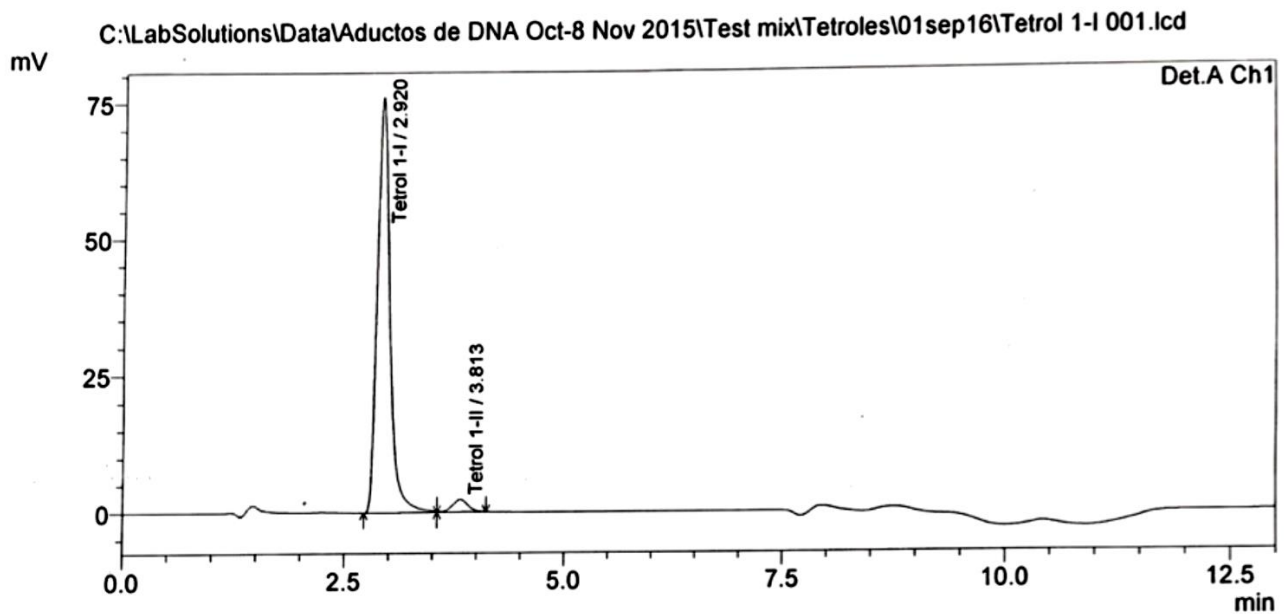


Figura 23. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [1.0 pg]

<Chromatogram>

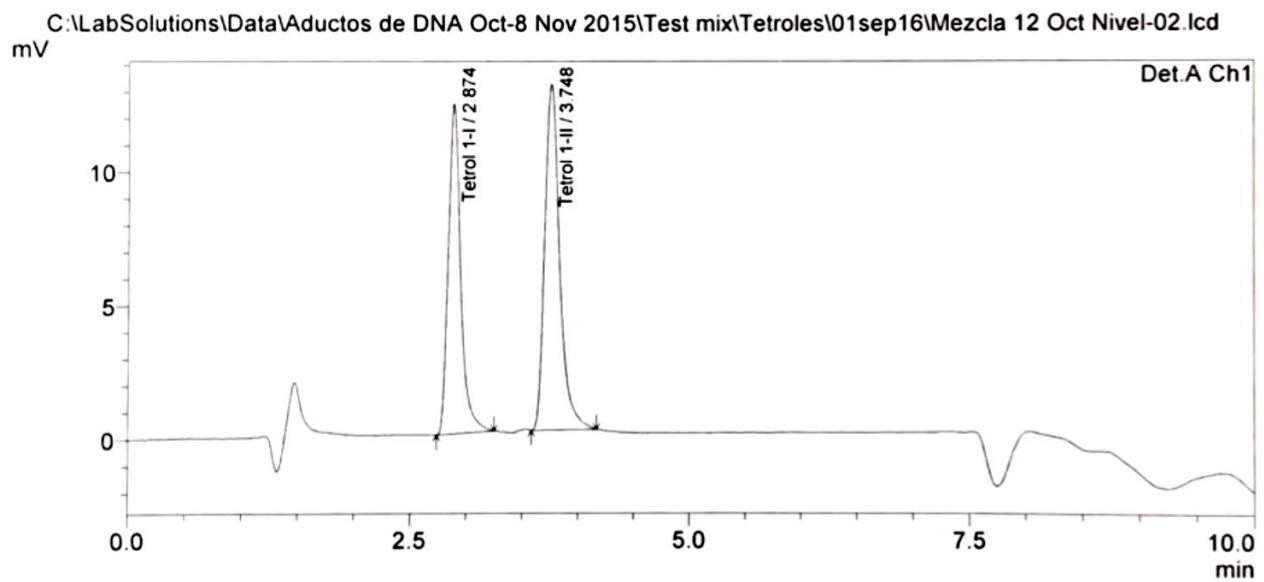


Figura 24. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [2.0 pg]

<Chromatogram>

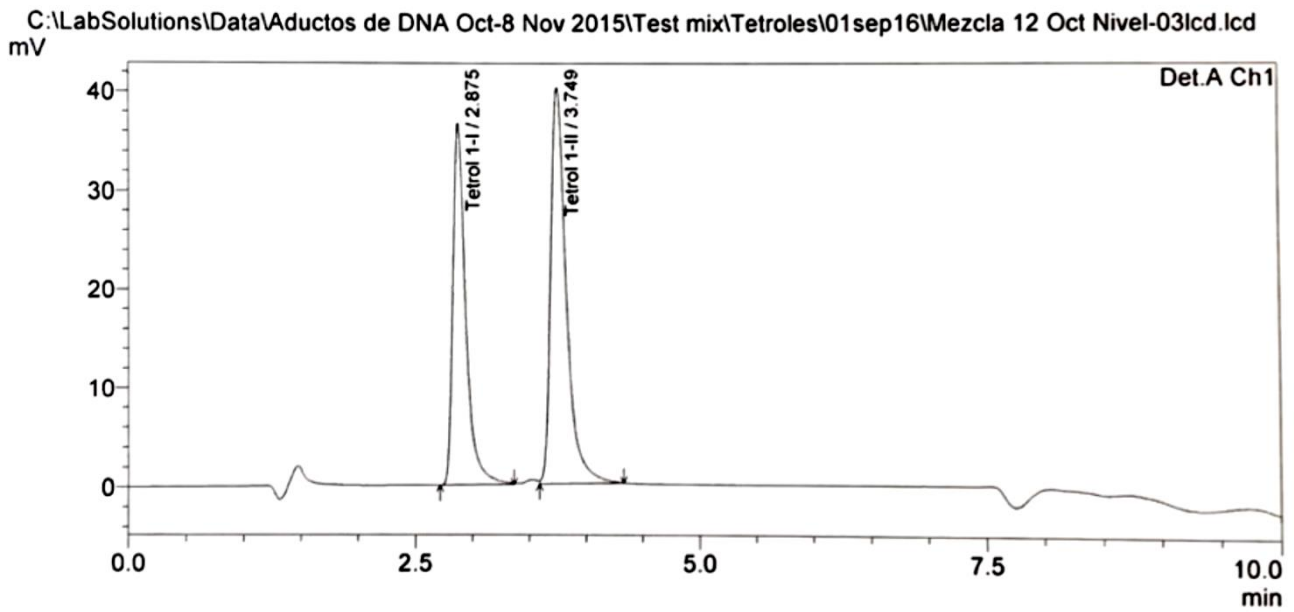


Figura 25. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [6.0 pg]

<Chromatogram>

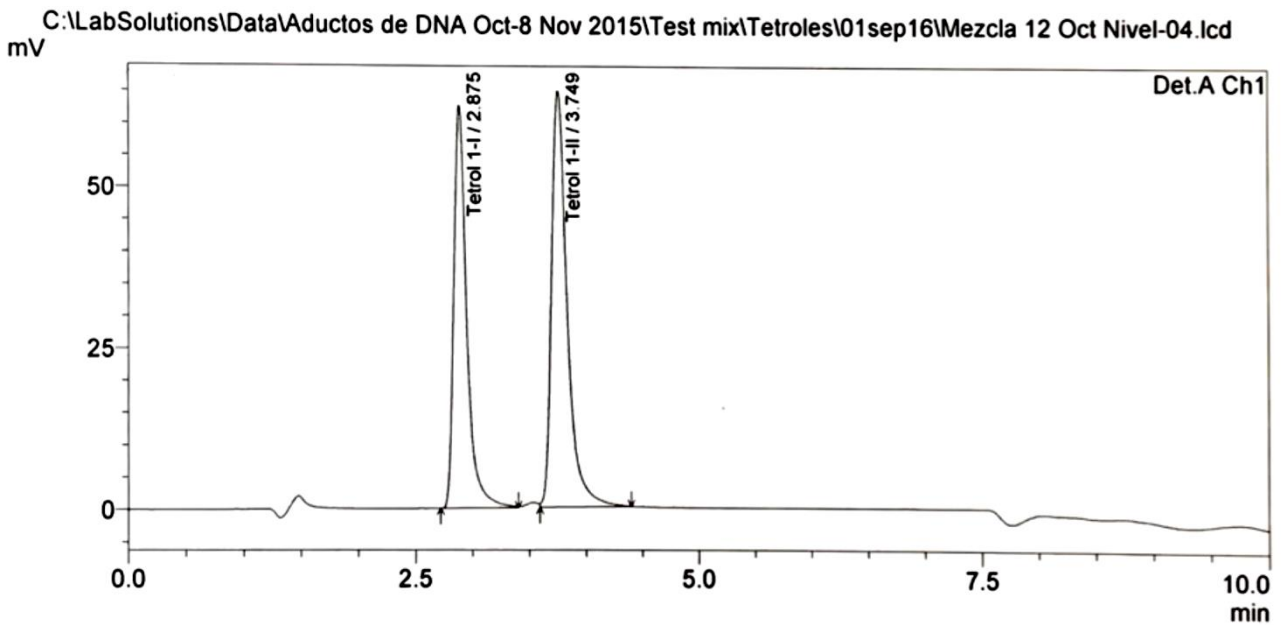


Figura 26. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [10.0 pg]

<Chromatogram>

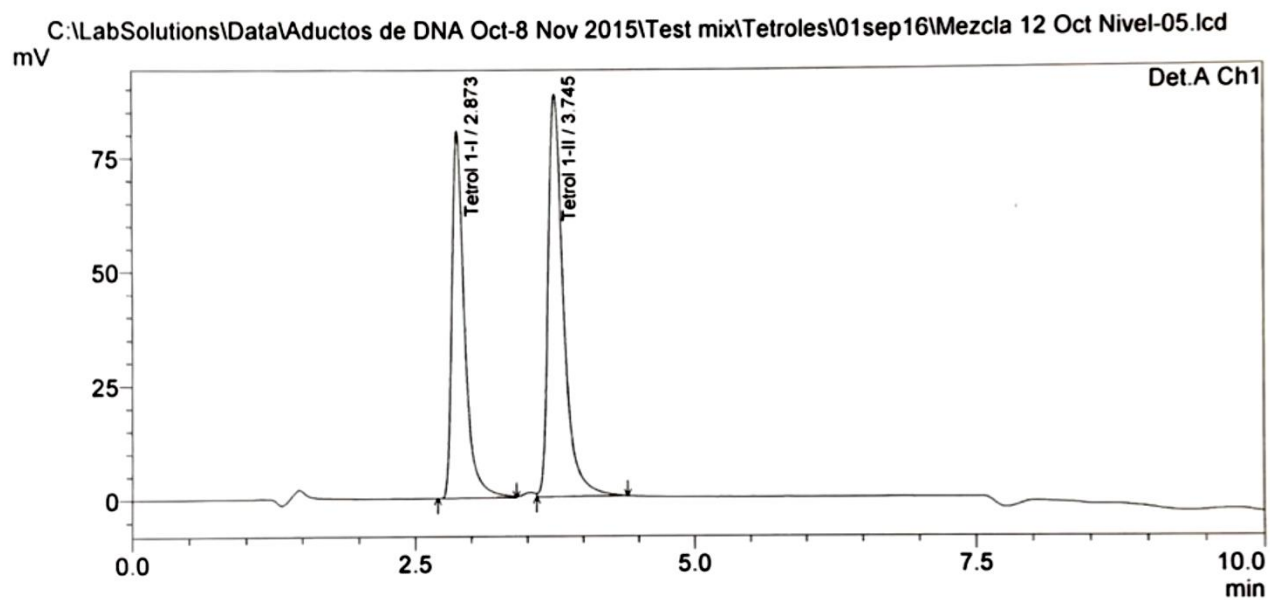


Figura 27. Cromatograma de la mezcla de T-I y T-II a [14.0 pg]