

Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD  
HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA No. 3  
“DR. VÍCTOR MANUEL ESPINOSA DE LOS REYES SÁNCHEZ”

**BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN GESTACIONAL A CONTAMINACIÓN  
AMBIENTAL EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MÉXICO  
(ZMCM) Y SU ASOCIACIÓN CON SALUD PERI Y POSNATAL.**

**RESULTADOS PRELIMINARES**

REGISTRO: R-2013-785-049

**TESIS**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

**ROXANA NAVARRO VARGAS**

ASESOR:

DRA. GUADALUPE VELOZ MARTÍNEZ

MÉXICO, DF

JULIO 2014



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.

## FIRMAS DE AUTORIZACIÓN

---

DR. JUAN CARLOS HINOJOSA CRUZ

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN SALUD

CMN LA RAZA UMAE HGO No. 3

“DR. VICTOR MANUEL ESPINOSA DE LOS REYES SÁNCHEZ”

---

DRA. GUADALUPE VELOZ MARTÍNEZ

JEFA DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

CMN LA RAZA UMAE HGO No. 3

“DR. VICTOR MANUEL ESPINOSA DE LOS REYES SÁNCHEZ”

---

DRA. VERÓNICA QUINTANA ROMERO

JEFA DE LA DIVISIÓN DE EDUCACIÓN EN SALUD

CMN LA RAZA UMAE HGO No. 3

“DR. VICTOR MANUEL ESPINOSA DE LOS REYES SÁNCHEZ”

## **DEDICATORIA**

A mi padre, el héroe de mi vida, quien siempre ha confiado en mí y que con su ejemplo de responsabilidad y entrega me ha demostrado que no hay imposibles.

A mi madre, que con su amor y sus consejos me ha enseñado que el único obstáculo es uno mismo.

A mi hermana Marisol, mi primera maestra, mi confidente, gracias por toda tu paciencia y dedicación.

A mi hermano Miguel, mi eterno niño, quien a pesar de mis ausencias, siempre está pendiente de mí, el único que sabe siempre mis días de guardia.

A mi cuñado Eutimio, que se ha convertido en un hermano para mí, gracias por siempre apoyar mis metas.

A mi sobrinos, los amores de mi vida; gracias Israel porque siempre has sabido cómo hacerme sentir mejor y por creer en mí, gracias Monserrat por darme tanto amor cada vez que te veo y llenarme de paz con tus abrazos.

Gracias...

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM, por ser desde siempre mi máxima casa de estudios.

A todos mis maestros del HGR 72 y de la UMA HGO3 por toda su paciencia, enseñanzas, anécdotas, que día tras día forjaron en mi esperanza, sueños, metas y que hoy con mucha satisfacción puedo agradecerles este logro más en mi vida.

A la Dra. Veloz por tomarme en cuenta, para este gran proyecto de investigación.

Al Dr. Pavel Petrosyan, por su gran cooperación para la determinación de aductos.

Al proyecto PAPIIT IN208914, por confiar en nuestro trabajo y darnos su apoyo.

BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN GESTACIONAL A CONTAMINACIÓN  
AMBIENTAL EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MÉXICO  
(ZMCM) Y SU ASOCIACIÓN CON SALUD PERI Y POSNATAL.

RESULTADOS PRELIMINARES

**Lugar de realización:** Unidad Médica De Alta Especialidad Hospital De Ginecología Y Obstetricia No 3 Centro Médico Nacional la Raza IMSS e Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

**Investigador Responsable:** María Guadalupe Veloz Martínez<sup>1</sup>

**Investigadores Asociados:** María Eugenia Gonsebatt Bonaparte<sup>2</sup>, Julieta Rubio Light Bourn<sup>2</sup>, Pavel Petrosyan<sup>2</sup>, Ollin Celeste Martínez Ramirez<sup>3</sup>, Roxana Navarro<sup>1</sup>, Marlene Erendira Pacheco Cazares<sup>1</sup>

1-Instituto Mexicano Del Seguro Social, 2- Universidad Nacional Autónoma De México (UNAM), 3- Instituto de Investigaciones Biomédicas de La UNAM.

Comunicación con el investigador responsable:

Dra. María Guadalupe Veloz Martínez

Adscrita a la división de investigación de la UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Domicilio. Seris y Antonio Valeriano SN Col La Raza Tel 57245900 ext. 23768

Correo: [maria.veloz@imss.gob.mx](mailto:maria.veloz@imss.gob.mx) [dralupitaveloz@gmail.com](mailto:dralupitaveloz@gmail.com)

## **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES**

Nombre: MARIA GUADALUPE VELOZ MARTINEZ

Adscripción: división de investigación de la UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La raza México D.F. 029900

Teléfono 57245900 ext. 23768

Correo: [maria.veloz@imss.gob.mx](mailto:maria.veloz@imss.gob.mx) [lupitaveloz\\_1@hotmail.com](mailto:lupitaveloz_1@hotmail.com)

Nombre: MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Adscripción: departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Domicilio: Calle Belisario Domínguez Número 13, Código Postal: 14070 Colonia San Fernando Delegación Tlalpan, Ciudad de México Teléfono: 555.6229179

E-mail: [margen@unam.mx](mailto:margen@unam.mx)

Nombre: JULIETA RUBIO LIGHT BOURN

Adscripción: departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Domicilio: Instituto de Investigaciones Biomédicas A.P. 70228, Ciudad Universitaria 04510 México D.F. Tel: (55) 5622-9178

[juruli@unam.mx](mailto:juruli@unam.mx)

Nombre: PAVEL PETROSYAN

Adscripción: departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Domicilio: Instituto de Investigaciones Biomédicas A.P. 70228, Ciudad Universitaria 04510 México D.F. Tel: (55) 5622-9178

[pavel@biomedicas.unam.mx](mailto:pavel@biomedicas.unam.mx)

Nombre: CELESTE OLLIN MARTÍNEZ RAMÍREZ

Adscripción: Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Domicilio: Instituto de Investigaciones Biomédicas A.P. 70228, Ciudad  
Universitaria 04510 México D.F. Tel: (55) 5622-9178

[etselec69@yahoo.com.mx](mailto:etselec69@yahoo.com.mx)

Nombre: ROXANA NAVARRO VARGAS

Adscripción: UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La raza México D.F. 029900

[rotsraza@gmail.com](mailto:rotsraza@gmail.com)

Nombre: MARLENE ERENDIRA PACHECO CÁCERES

Adscripción: UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN col La raza México D.F. 029900

[emarca10@hotmail.com](mailto:emarca10@hotmail.com)

Nombre: JORGE ALFONSO MACIEL RUIZ

Adscripción: Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Domicilio: Instituto de Investigaciones Biomédicas A.P. 70228, Ciudad  
Universitaria 04510 México D.F.

[jmaciel.lp@gmail.com](mailto:jmaciel.lp@gmail.com)



## ÍNDICE

<b>TEMA</b>	<b>PAGINA</b>
<b>1. RESUMEN</b>	<b>8</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>11</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>20</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>21</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>38</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>11. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES</b>	<b>42</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>43</b>
<b>13. ANEXOS</b>	<b>50</b>

## **1. RESUMEN**

### **BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN GESTACIONAL A CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MÉXICO (ZMCM) Y SU ASOCIACIÓN CON SALUD PERI Y POSNATAL**

#### **Antecedentes**

La exposición gestacional se asocia a una mayor susceptibilidad para desarrollar enfermedades cardiovasculares, metabólicas y cáncer en la vida adulta. Además, existen evidencias que indican que estos efectos pueden ser pasados a subsecuentes generaciones. En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México se emiten más de 300 mil toneladas de contaminantes al año. A los agentes tóxicos en aire, suelo y agua hay que sumarles los que se ingieren con los alimentos como los hidrocarburos, plaguicidas, ftalatos y aflatoxinas. Hemos demostrado que los habitantes jóvenes de la ZMCM tienen niveles elevados de aductos en ADN formados por la presencia de contaminantes ambientales<sup>1</sup>. Además, tenemos evidencias preliminares en recién nacidos que sugieren exposición gestacional a estos agentes potencialmente carcinogénicos. El nivel de aductos detectados en estos niños es dos o tres veces superior al detectado en sus madres (ver figura 1) y sería importante poder asociarlo a otros biomarcadores y a parámetros como peso al nacimiento, exposición materna, malformaciones y prematuridad sin causa aparentes, por otra parte, este estudio podrá sentar las bases para la realización de un estudio de cohorte de la población de recién nacidos a los que se determinen los niveles de contaminantes.

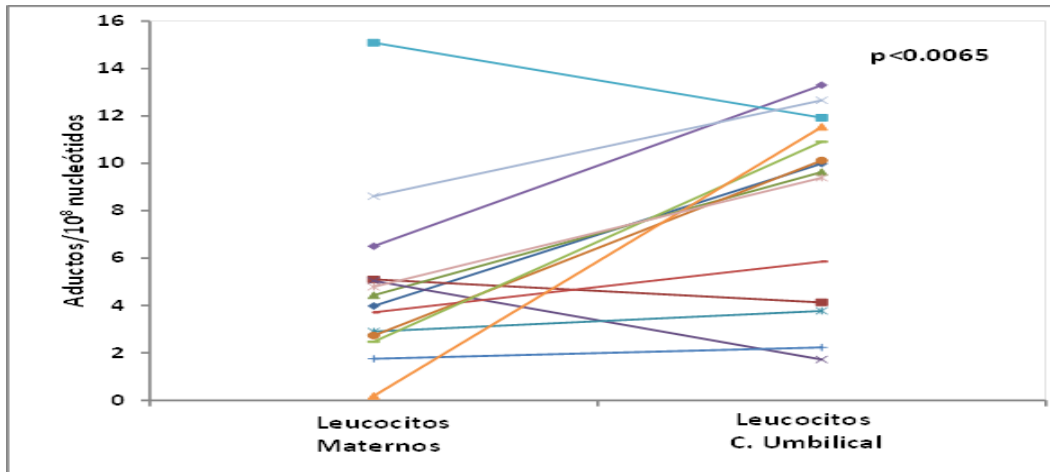


Figura 1 niveles de aductos en células maternas y fetales

**Objetivo:** investigar la presencia de biomarcadores de exposición y de efecto temprano en al menos 150 recién nacidos a lo largo de un año en la ZMCM y asociarlo a otros biomarcadores y a parámetros como peso al nacimiento, calificación APGAR.

**Material y Métodos:** Se obtendrán 150 pares de muestras Madre-Recién nacido, expuestos a partículas atmosféricas de la ZMCM; por el momento se tienen 70 pares. Las muestras son de madres residentes de la ZMCM, captadas en la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Gineco Obstetricia No.3 C.M.N. La Raza. La exposición ambiental se caracterizó a través de un cuestionario de las participantes acerca de sus hábitos de vida, antecedentes familiares, y utilizando los registros de la red de monitoreo ambiental (RAMA). Se colectaron 10 mL de sangre periférica de la madres y 10 mL de sangre de cordón umbilical del recién nacido al momento del parto para la determinación de aductos en el DNA; así como 5 cm<sup>3</sup> de tejido de placenta en su cara materna y 5 cm<sup>3</sup> de cara fetal, que posteriormente se utilizarán para la determinación de la expresión de enzimas de fase I y de reparación del DNA. Asimismo, se colectaron 10-20 mL de orina de las madres para realizar determinaciones de cotinina.

Los biomarcadores de efecto temprano que se investigaron fueron aductos abultados o “bulky” en ADN; así como determinación de niveles de cotinina en orina que sirve para reconocer a los fumadores activos. Los biomarcadores de

exposición se correlacionaron con el peso y valor de prueba de Apgar, mediante análisis de regresión múltiple y multivariados para estimar el impacto potencial de la exposición gestacional en la salud del recién nacido. El tamaño muestral se estimó de acuerdo a la asociación observada en un estudio longitudinal, entre el polimorfismo *GSTM* null y los niveles de aductos en adultos jóvenes que viven en la ZMCM<sup>1</sup>.

**Resultados:** La determinación de cotinina en orina, funciona como un biomarcador de exposición al humo del tabaco, debido a que en este estudio sólo se evaluó el efecto de la exposición ambiental a PM; se realizaron determinaciones en 68 muestras, de las cuales todas (68/68) han resultado negativas (>200ng/mL cotinina), lo cual es un buen indicador de la efectividad del cuestionario y la aplicación de los criterios de inclusión/exclusión, los procesos de encuesta y selección son efectivos. Una vez analizadas las muestras para la prueba de cotinina, se realizó la determinación de los niveles de aductos en el DNA en una muestra pequeña (n=23) de la población que se tiene, y además se analizaron muestras provenientes de la ciudad de Cuautla, Morelos (n=4), las cuales provienen de una zona menos contaminada comparada con la ZMCM. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en otras investigaciones, en donde los recién nacidos poseen en la mayoría de las ocasiones, niveles de daño más alto que sus madres. Al realizar una correlación de Pearson, los resultados no muestran ninguna correlación significativa entre los niveles de aductos y el peso del recién nacido y de la misma manera, no es posible apreciar alguna correlación con el índice APGAR.

**Conclusiones:** Se corroboró el aumento de PM en estaciones secas. Se comprobó la mayor cantidad de aductos en fetos de la ZMCM. Es probable que los resultados obtenidos no muestren una clara correlación, debido al reducido tamaño muestral.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### *Exposición gestacional*

Estudios epidemiológicos han establecido una estrecha relación entre el peso al nacimiento y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas<sup>2,3</sup> Ello llevó a Gluckman<sup>4</sup> a proponer una programación fetal que depende del ambiente intrauterino que puede optimizar la estructura y función de los órganos in utero en el corto plazo, pero contribuir en el largo plazo al desarrollo de enfermedades o padecimientos en la niñez y en la adultez, si estas adaptaciones no se ajustan a los nuevos ambientes. A estos cambios se agregan los epigenéticos como mecanismo en el cual se pueden basar muchas de las respuestas adaptativas. Existen ejemplos claros de exposiciones gestacionales que tienen en el corto y largo plazo consecuencias en la salud y el riesgo para desarrollar enfermedad.

La exposición gestacional al humo de tabaco se asocia a bajo peso al nacimiento, nacimientos pretérmino o prematuros y a obesidad en la niñez así como a desórdenes en el neurodesarrollo y comportamiento<sup>5</sup> Se piensa que los efectos del humo del tabaco pueden estar mediados por hipoxia crónica, disminución del flujo sanguíneo en la placenta, aumento de carboxihemoglobina y posibles efectos de la nicotina<sup>6</sup>, además de una mala nutrición por la supresión del apetito que causa el hábito de fumar. También se han demostrado relaciones gen-ambiente en relación a la exposición gestacional a humo de tabaco. Por ejemplo madres fumadoras portadoras del polimorfismo del gen DAT1 y/o del receptor de dopamina DRD4 tuvieron un mayor riesgo para el diagnóstico de desorden de déficit de atención por hiperactividad en estos niños<sup>7</sup>

Asimismo, existen evidencias que muestran que la exposición a partículas respirables como las menores de 2.5 micras (PM<sub>2.5</sub>) se asocia a bajo peso al nacimiento y a nacimientos pretérminos<sup>8</sup>. Estos efectos dependen del origen y la composición de las PM<sub>2.5</sub><sup>9</sup>.

En la ciudad de México el análisis de muestras de sangre de cordón umbilical obtenidas de un banco de muestras biológicas (ELEMENT) de recién nacidos

entre los años 1994 y 1995, mostró que la exposición prenatal a plomo se encontró inversamente relacionada con la metilación genómica del DNA en células del cordón umbilical<sup>10</sup>.

Resulta relevante revisar el nivel de exposición gestacional a plomo en la actualidad, especialmente porque en nuestro país existen estudios prospectivos que relacionan la concentración de plomo en sangre y la disminución en la función intelectual y neurológica en niños expuestos directamente a este elemento en los primeros meses de vida<sup>11, 12,13</sup>.

### *Modulación epigenética*

La exposición gestacional puede causar alteraciones a largo plazo a través de mecanismos epigenéticos<sup>14</sup>. Los procesos epigenéticos están involucrados en la diferenciación celular humana desde el inicio del desarrollo. En los estadios iniciales del desarrollo, se establecen epigenomas que modulan cómo células con el mismo genoma se diferencian y forman los tejidos y órganos del cuerpo y el cerebro.

En mamíferos la metilación del DNA y las modificaciones en las histonas son los principales mecanismos epigenéticos, creando diferentes programas de expresión génica sin cambios en la secuencia del DNA. Mientras que las modificaciones a histonas confieren cambios transitorios en la expresión génica, la metilación del DNA produce silenciamientos de largo plazo en secuencias específicas. Este silenciamiento de largo plazo puede ser desactivado por desmetilación<sup>14</sup>.

Los procesos epigenéticos por exposición prenatal han sido demostrados en modelos animales y en muy pocos estudios epidemiológicos<sup>5,10</sup>. Sin embargo dado que las citosinas metiladas son muy estables y las técnicas experimentales requieren poca muestra, el estudio de la metilación de locus específicos resulta un indicador de exposición factible e importante de estudiar en población en riesgo.

### *Contaminación ambiental en la ZMCM*

La zona metropolitana de la Ciudad de México es una de las zonas urbanas de mayor contaminación en el mundo. Está ubicada a 2240 metros sobre el nivel del mar y se encuentra rodeada por cadenas montañosas que impiden la libre circulación del aire, lo cual agrava las condiciones ambientales y complica la identificación de las fuentes emisoras dado que los vientos circulan preponderantemente de norte a sur. De esta manera los habitantes de la zona sur pueden estar expuestos a las emisiones originadas en el norte del valle de México.

Existen además, importantes problemas relacionados con la industria y el transporte. Se estima que el parque vehicular de la zona metropolitana es actualmente de más de 3 millones de vehículos, con un crecimiento de 10% anual, lo cual genera un elevado consumo de combustibles con la consecuente emisión de contaminantes. Los niveles máximos recomendados para partículas y ozono se rebasan casi diariamente<sup>15</sup>

La combustión de gasolina libera en la atmósfera una mezcla de hidrocarburos, muchos de los cuales se consideran peligrosos para la salud, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en Inglés), nitroarenos y compuestos orgánicos volátiles (VOCs). Los monitores de la Red de Monitoreo Ambiental (R.A.M.A.) de la Cd. de México miden diariamente los niveles de SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> y las partículas suspendidas menores de 10 micras. Sólo una estación determina directamente los niveles de hidrocarburos, como el tolueno y el benceno (clasificados como VOCs, los cuales también incluyen al formaldehído). En México, aún no existe una norma para los hidrocarburos en general, en lo referente a la calidad del aire atmosférico; sin embargo, en la Comunidad Europea una disposición emitida en el año 2000 propuso bajar la concentración del benceno en el aire a 5 microgramos por metro cúbico para el año 2010<sup>16</sup>. A pesar de que la asociación de la exposición a benceno y otros agentes tóxicos, con el desarrollo de enfermedades es conocida, en México no existen datos a este respecto. Por ejemplo, el benceno, a niveles atmosféricos tan

bajos como 1 microgramo por metro cúbico podría representar un riesgo de padecer leucemia para los individuos expuestos crónicamente<sup>16</sup>. Así mismo, la exposición crónica a PAHs se asocia desde hace casi 20 años, con una mayor incidencia de cáncer de pulmón<sup>17</sup>, laringe <sup>18</sup> y esófago<sup>19</sup>. Un reporte de la American Heart Association (AHA) establece la asociación entre las enfermedades cardiovasculares y la contaminación ambiental<sup>20</sup>, especialmente en el caso de la presencia de partículas menores de 2.5 µm. Ello ocurre a través de un incremento en la coagulación/trombosis, propensión a arritmias, vasoconstricción arterial, respuestas inflamatorias sistémicas y la promoción crónica de aterosclerosis. Con evidencias similares Romieu y Borja Aburto<sup>21</sup> sugirieron que, a pesar de la incertidumbre en los mecanismos de registro, existe suficiente evidencia en Latinoamérica para afirmar que las partículas son nocivas para la salud, y que se requieren urgentes medidas de control de emisiones. Las recomendaciones actuales de la OMS son para las partículas menores de 2.5 micras (PM<sub>2.5</sub>), se sugiere un promedio anual no mayor a 10 µg/m<sup>3</sup> o no exceder de 25 µg/m<sup>3</sup> en promedio al día. En cuanto a las menores de 10 micras (PM<sub>10</sub>) se recomienda no exceder un promedio anual de 20 µg/m<sup>3</sup> o 50 µg/m<sup>3</sup> (OMS, 2005). En la ZMCM estos criterios no se cumplen<sup>22</sup>.

Existen reportes que han demostrado que los contaminantes atmosféricos en la ciudad de México son mutagénicos<sup>23</sup>, genotóxicos<sup>24, 25, 26, 27, 28</sup>, y que los mexicanos poseen variantes alélicas de riesgo para cáncer por exposición a hidrocarburos <sup>29, 30</sup>. Además se ha observado que el vivir en la ciudad de México impacta la función olfatoria<sup>31, 32</sup>. Habitantes jóvenes de la Ciudad de México presentan una cantidad más elevada de aductos de PAH (hidrocarburos aromáticos policíclicos) en el DNA de sus leucocitos, en la época de invierno o época seca, asociados además al incremento en partículas suspendidas y a ciertas variantes alélicas de riesgo (Tabla 1) <sup>1</sup>.

Además, en la ZMCM, la exposición a ozono y a óxidos de nitrógeno incide significativamente sobre el número de consultas médicas ocasionadas por motivos respiratorios, de la población menor de 15 años<sup>33</sup>.



El plomo es uno de los metales tóxicos que no sólo se encuentra presente en aire (partículas suspendidas) y en el polvo, sino también se puede encontrar en el agua, alimentos y el material de plomería. El vanadio, cadmio, níquel y zinc son metales que se han reportado en el material particulado de la ZMCM<sup>15</sup>.

Otros contaminantes importantes en la exposición prenatal son los plaguicidas como los compuestos organoclorados (DDT y DDE) y organofosforados, utilizados primordialmente en el ámbito agrícola y el control de plagas. En la ZMCM persisten zonas agrícolas de cultivo intensivo como Xochimilco, Miltpa Alta y Tlahuac que además pueden estar presentes no sólo en el suelo y en los cuerpos de agua, sino también en los alimentos que consume la población. El impacto en la salud ha sido investigado en varios reportes<sup>34, 35</sup> con resultados contradictorios, sin embargo sus posibles efectos epigenéticos en el DNA de recién nacidos no han sido estudiados.

Los ftalatos son sustancias químicas utilizadas no sólo en una gran cantidad de productos de uso industrial sino también de consumo diario. La exposición a ftalatos de bajo peso molecular como el dietil ftalato y el di-n-butil ftalato (DBP, por sus siglas en inglés) ocurre a través de productos de uso personal como perfumes, cosméticos, lociones. La exposición a ftalatos de mayor peso molecular como el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y el butilbenzil ftalato (BBzP) ocurre a través de su uso como agentes plastificantes en productos de cloruro de vinilo flexibles como las botellas de bebidas, empaques de alimentos. La exposición a DBP, DEHP y BBzP se ha asociado en la ciudad de México a embarazos pretérmino<sup>36</sup>. Dentro de compuestos orgánicos persistentes a los que nos exponemos a través de los alimentos, agua y suelo se encuentran los bifenilos policlorados (PCB). Existe normatividad clara para evitar la exposición a estos agentes tóxicos a través del agua y los alimentos, sin embargo persisten los equipos eléctricos, equipos contaminados, líquidos, sólidos y residuos peligrosos que los contienen o están contaminados con ellos<sup>37</sup>.

El feto tiene generalmente un mayor riesgo que el adulto cuando se expone a agentes tóxicos ambientales. En ello intervienen varios factores como una mayor

absorción y acumulación de sustancias químicas por parte del feto, la incapacidad de hígado fetal para metabolizar y eliminar toxinas de manera eficiente, inmadurez de los procesos de reparación del DNA e inmunológicos y una alta tasa de proliferación celular. Por otro lado los agentes tóxicos pueden afectar el desarrollo fetal a través de blancos celulares específicos o alterando la placenta y el flujo de nutrientes hacia el feto. Por lo tanto la exposición gestacional puede generar cambios procarcinógenos en el DNA fetal en la forma de aductos o mutaciones así como cambios epigenéticos <sup>38</sup>.

### *Biomarcadores biológicos*

Los indicadores o biomarcadores en un sentido amplio incluyen a casi cualquier medida que refleja una interacción entre un sistema biológico y un peligro (riesgo) potencial el cual puede ser químico, físico o biológico. La medida de la respuesta puede ser funcional o fisiológica, bioquímica a nivel celular o una interacción molecular. El análisis de tejidos y fluidos corporales para buscar xenobióticos y/o sus metabolitos, enzimas y otras sustancias bioquímicas se han usado para documentar la interacción de agentes químicos con sistemas biológicos. Las mediciones de aquellas sustancias ahora referidas como “indicadores o biomarcadores” son reconocidos por proveer datos que vinculan la exposición a un agente químico con la dosis interna y la respuesta que es relevante en el proceso de evaluación de riesgo.

### *Tipos de biomarcadores*

Biomarcador de exposición: una sustancia exógena o su metabolito o el producto de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula blanco o célula que es medida en un compartimiento dentro de un organismo.

Biomarcador de efecto: una medición bioquímica, fisiológica o de comportamiento u otra alteración dentro de un organismo que depende a su vez de la magnitud, puede ser reconocido como asociado con el establecimiento de un posible daño a la salud o enfermedad.

Biomarcador de susceptibilidad: un indicador de habilidad heredada o adquirida de un organismo para responder al desafío o exposición a una sustancia xenobiótico específica. Por ejemplo las personas portadoras de algunas variantes alélicas como el *GSTM* null poseen un mayor riesgo para desarrollar daño genético por exposición a humo de tabaco<sup>1</sup>.

*Metabolismo de agentes tóxicos y su relación con la bioactivación de carcinógenos.*

Las sustancias químicas solubles en lípidos son metabolizadas principalmente en el hígado, pero también en el resto de los tejidos (en menor medida) para su eliminación. En este proceso se generan metabolitos reactivos (bioactivos) que pueden reaccionar con moléculas vecinas como proteínas o si difunden en las células hasta con el DNA. Tal es el caso de los carcinógenos contenidos en el humo del tabaco, el aire contaminado por la combustión de productos del petróleo o del carbón, alimentos asados con carbón o contaminados por aflatoxinas. Las proteínas o enzimas responsables de estos procesos son los citocromos P450 o CYP, así como las glutatión S transferasas. Existen individuos que poseen variantes genéticas con actividades diferentes en la población y en algunos casos se ha podido asociar la presencia de estas variantes con un mayor número de aductos (Tabla 1)<sup>1,39</sup>, lo cual los haría susceptibles a un mayor riesgo para desarrollar enfermedad. En nuestro caso, observamos que los individuos portadores de las variantes *GSTM* null y *CYP1B1*\*3 (rs1056836), presentan un mayor nivel de aductos en la ZMCM, por lo que nos interesa profundizar en estos biomarcadores de susceptibilidad.

*Aductos en DNA y su reparación como biomarcadores.*

El biomarcador que mejor se ha correlacionado con la exposición a mezclas de hidrocarburos aromáticos policíclicos y humo de tabaco es la presencia de los aductos o “adiciones” en el DNA. Dado que su presencia es ubicua y que se presentan en distintas formas químicas, la exposición se puede determinar más específicamente porque forman aductos con proteínas o con el DNA. Estos

pueden determinarse en muestras de tejidos blanco de la exposición o en leucocitos de sangre periférica. En el caso de los aductos en el DNA, su presencia se asocia con mutaciones específicas y se los considera indicadores de riesgo para cáncer<sup>40</sup>. Su formación se ha asociado con variantes genéticas de riesgo como algunos alelos de enzimas de los citocromos P450 como el CYP1A1, las glutatión S-transferasas (GSTs), etc, en numerosos estudios <sup>1,40, 41, 42, 43, 44,.</sup> La determinación de estos indicadores de susceptibilidad que pueden ser exclusivos de la población mexicana resultan de utilidad para la estimación de riesgo a la salud en sus portadores.

		R	P	
			PM <sub>10</sub>	PM <sub>2.5</sub>
<b>Temporadas</b>				
<b>Época seca</b>				
<b>Aductos</b>	<b>PAH-DNA</b>	0.209	<b>0.048</b>	0.216
(n=92)				
NO, CYP1B1*3	(n=9)	0.845	0.116	<b>0.023</b>
SE, GSTM1 nulo	(n=23)	0.533	<b>0.035</b>	<b>0.013</b>
<b>Época de lluvias</b>				
<b>Aductos</b>	<b>PAH-DNA</b>	0.169	0.528	0.128
(n=92)				
NO, CYP1B1*3	(n=9)	0.285	0.780	0.775
SE, GSTM1 nulo	(n=23)	0.311	0.362	0.215
<b>Época seca (n=79)</b>				
% Ab. Cromosómicas		0.132	0.669	0.399
<b>Época de lluvias (n=89)</b>				
% Ab. Cromosómicas		0.043	0.709	0.843

**Tabla 1.** Análisis de regresión múltiple (R) entre los niveles de PM reportados en la RAMA en las zonas NO: noroeste; SE: sureste, niveles de aductos PAH-DNA, porcentajes de aberraciones cromosómicas y variantes alélicas en enzimas metabólicas. Época seca: Noviembre-Abril, Época de lluvias: Mayo-Octubre<sup>1</sup>.

Existen varias metodologías para estimar la presencia de aductos o adiciones en el DNA, una de ellas es la metodología de post marcaje con fósforo 32 ( $^{32}\text{P}$ ) y que permite estimar la formación de aductos “bulky” o “abultados” que deforman la hélice del DNA. Este tipo de daño, cuando es detectado, es reparado por las enzimas de la vía de reparación de nucleótidos o vía NER (nucleotide excision repair). Dentro de esta vía, hemos encontrado que la enzima ERCC2 se encuentra inducida en un modelo murino de exposición a partículas de la ZMCM<sup>44</sup>. Por lo que consideramos relevante investigar los niveles de transcritos de mRNA en las muestras de tejidos que vamos a analizar, así como la presencia de la variante genética *ERCC2* (rs13181), en la población a estudiar puesto que su presencia ha sido asociada con mayores niveles de aductos en DNA<sup>45</sup>.

#### *Cuantificación de regiones de metilación diferencial (DMR; differential methylated regions)*

La modificación epigenética más importante es la metilación en dinucleótidos CpG que define regiones DMR, las cuales son específicas para cada alelo parental. La exposición gestacional puede causar alteraciones en las DMR que se han asociado a enfermedad <sup>14, 46</sup>. Nos interesa estimar cuantitativamente los patrones de metilación en el DNA materno y del recién nacido en 4 regiones DMR: IG-DMR, H19 DMR/región control de “imprinting” (RCI), IGF2R DMR y PEG10 DMR para investigar su posible asociación con la exposición ambiental determinada en las muestras de orina y sangre. Para ello adaptaremos el uso de una plataforma bioinformática del tipo “Quantitative Differentially Methylated Region”<sup>47</sup>. Este análisis podrá ser extendido a otras regiones que se consideren de interés dado el crecimiento exponencial que está teniendo este campo en el diagnóstico clínico. Las DMR que se incluyen en este estudio están asociadas a bajo peso al nacimiento o nacimiento prematuro<sup>46, 48</sup>

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La investigación de biomarcadores de exposición gestacional a contaminantes ambientales es una propuesta de investigación aplicada, porque la información que genere permitirá estimar el impacto que produce en la salud del recién nacido la contaminación de la ZMCM. Nuestro grupo de trabajo tiene evidencias no sólo de la presencia de estos contaminantes en adultos jóvenes<sup>1</sup> sino que en datos previos hemos encontrado que la cantidad de aductos de metabolitos de hidrocarburos en los recién nacidos, triplica los niveles encontrados en el ADN de sus madres<sup>49</sup>. Esta información original resulta relevante de profundizar ya que estaremos utilizando biomarcadores de susceptibilidad y de riesgo para cáncer utilizados ampliamente en la epidemiología molecular. También nos interesa documentar si esta exposición, así como los hábitos de vida puede generar cambios epigenéticos asociados al desarrollo de enfermedades en la edad adulta de importancia epidemiológica en nuestro país como bajo peso al nacimiento, muerte perinatal, obesidad y diabetes. Es importante mencionar que existen evidencias que sugieren que los cambios epigenéticos pueden afectar varias generaciones.

La propuesta se encuentra dentro de la demanda de Medio Ambiente y Salud de la convocatoria del fondo sectorial CONACYT-Secretaría de Salud y contempla la evaluación de biomarcadores de exposición gestacional a contaminantes ambientales. Ello le confiere una aplicación en la salud perinatal y pediátrica ya nos permitirá identificar a contaminantes que aumenten el riesgo a desarrollar enfermedad, puesto que los biomarcadores que investigaremos son de riesgo para el bajo peso al nacimiento, muerte perinatal e incapacidad dado puesto que se puede generar neurotoxicidad o riesgo de retraso mental y cáncer. Permitirá así mismo que se puedan emitir recomendaciones y normatividad (ambiental o de hábitos y costumbres) para reducir la exposición. Además de que este estudio podrá sentar las bases para la realización de un estudio de cohorte de la población de recién nacidos a los que se determinen los niveles de contaminantes.

#### **4. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA**

El feto tiene generalmente un mayor riesgo que el adulto cuando se expone a agentes tóxicos ambientales. En ello intervienen varios factores como una mayor absorción y acumulación de sustancias químicas por parte del feto, la incapacidad de hígado fetal para metabolizar y eliminar toxinas de manera eficiente, inmadurez de los procesos de reparación del DNA e inmunológicos y una alta tasa de proliferación celular. Por otro lado los agentes tóxicos pueden afectar el desarrollo fetal a través de blancos celulares específicos o alterando la placenta y el flujo de nutrientes hacia el feto. Por lo tanto la exposición gestacional puede generar cambios pro carcinógenos en el DNA fetal en la forma de aductos o mutaciones así como cambios epigenéticos.

## **5. OBJETIVOS**

Determinar la exposición gestacional a agentes tóxicos ambientales en la ZMCM mediante el uso de biomarcadores de exposición y su impacto en salud mediante biomarcadores de efecto y susceptibilidad utilizando muestras de orina y sangre materna, en sangre de cordón umbilical y muestras de placenta.

### **Objetivos particulares**

Correlacionar los niveles de aductos en el DNA en el feto, en función de la concentración estacional de PM en la ZMCM.

Correlacionar los niveles de cotinina con los resultados obtenidos de los cuestionarios en relación al antecedente de tabaquismo.

Correlacionar los biomarcadores de exposición con el peso y el valor de prueba de Apgar y con los indicadores de efecto temprano mediante un análisis multivariado que permitan identificar a los agentes de riesgo.



## **6. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La exposición gestacional a la contaminación ambiental en la ZMCM se asociará a niveles más elevados de aductos “bulky” en el DNA de los recién nacidos durante la época de elevada contaminación ambiental (época seca). La presencia de aductos en ADN se asociará positivamente a la presencia de biomarcadores de susceptibilidad como son las variantes alélicas *GSTM* null, *CYP1B1*\*3 (rs1056836) y *ERCC2* (rs13181) maternas y en el recién nacido y con alteraciones en la metilación de zonas de metilación diferencial y de “imprinting” (DMR y RCI).

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se inscribe dentro de la epidemiología molecular, se trata de un estudio transversal descriptivo en donde se estima el riesgo a la salud a través de la identificación de la prevalencia de aductos en DNA y de contaminantes en muestras de sangre y orina de madres y en sangre de cordón umbilical de recién nacidos que viven en la ZMCM y su asociación con peso del producto, valor de prueba de Apgar y variantes alélicas de riesgo.

<b>CRITERIOS CONTEMPLADOS EN EL ESTUDIO.</b>		
<i>Inclusión</i>	<i>Exclusión</i>	<i>Eliminación</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• &gt;34 semanas de gestación.</li><li>• 19-35 años.</li><li>• Feto vivo.</li><li>• Que acepten participar y firmen la carta de consentimiento de colaboración.</li><li>• Que hayan permanecido en la zona de residencia en los últimos 3 meses.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pacientes con cualquier tipo de diabetes.</li><li>• Pacientes con tabaquismo.</li><li>• Pacientes con cáncer.</li><li>• Pacientes con exposición ocupacional a metales o hidrocarburos aromáticos policíclicos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Recién nacidos con fenotipo compatible con cromosomopatía.</li><li>• Pacientes que presenten ruptura prematura de membranas asociada a proceso infeccioso.</li></ul>

### *Tamaño de muestra.*

Se decidió estimar el tamaño mínimo muestral tomando en cuenta que la asociación encontrada con la variante genética *GSTM1 null* y los niveles de aductos en un estudio longitudinal previo realizado por nuestro grupo de trabajo<sup>1</sup>.

Para ello utilizamos la ecuación:  $n = (Z_{\beta(1)} + Z_{\alpha}/\zeta_0)^2 + 3$ , donde  $\zeta_0$  es la transformación de Fisher de  $\rho_0$ ,  $\beta(1)=0.01$  y  $\alpha=0.05$  y  $r=0.5$ ,  $z=0.5493$ <sup>50</sup>, lo que arrojó un tamaño muestral de 64 muestras de sangre materna y 64 de sangre de cordón umbilical. En este estudio transversal las muestras fueron tomadas a lo largo de de octubre del 2011 hasta mayo del 2014 y se estratificaron por estación de lluvias y seca, reportándose estudios preliminares, ya que tamaño muestral estimado es de 150 pacientes con sus hijos.

### *Descripción general del estudio*

En las áreas de hospitalización de la UMAE HGO 3 se identificó a mujeres que se encontraban próximas al nacimiento de su hijo por parto o cesárea y que cumplían los criterios de selección. Se les explicó en que consistía el proyecto de investigación y se les invitó a participar en el mismo, las pacientes que aceptaron, firmaron carta de consentimiento informado y una vez obtenido éste, se les interrogó sobre domicilio, edad, paridad, peso y talla, ocupación, hábitos de alimentación, exposición a contaminantes por cercanía de la vivienda con gasolineras, fabricas de pinturas, solventes, etc. Tabaquismo activo o pasivo. Se les pidió número telefónico para su localización pasados 28 días del nacimiento de su hijo, con la finalidad de verificar la supervivencia del recién nacido.

Se colectaron 10 mL de sangre periférica de la madres y 10 mL de sangre de cordón umbilical del recién nacido al momento del parto para la determinación de aductos en el DNA. Además, se tomaron 5 cm<sup>3</sup> de tejido de placenta en su cara materna y 5 cm<sup>3</sup> de cara fetal, que posteriormente se utilizarán para la determinación de la expresión de enzimas de fase I y de reparación del DNA. Asimismo, se colectaron 10-20 mL de orina de las madres para realizar determinaciones de cotinina.

Las muestras biológicas se congelaron a -20°C, y posteriormente fueron enviadas al Instituto de Investigaciones Biomédicas en donde se almacenaron a -70°C para su procesamiento y análisis.

Del recién nacido se registraron el peso, Apgar, edad gestacional al momento del nacimiento, presencia de malformaciones, valoración de Capurro, se hará seguimiento del recién nacido hasta su egreso del hospital y vía telefónica a los 28 días de vida extrauterina para descartar muerte neonatal. Se tomaron 3 nacimientos por semana durante el año para tener población expuesta a lo largo del año y en las dos temporadas: de lluvias (Mayo-Octubre) y seca (Noviembre-Abril).

La exposición ambiental se caracterizó a través de los resultados arrojados del interrogatorio realizado acerca de sus hábitos de vida, antecedentes familiares, e y utilizando los registros de la red de monitoreo ambiental (RAMA). Los biomarcadores de efecto temprano que se investigaron fueron aductos abultados o “bulky” en ADN, así como determinación de niveles de cotinina en orina. Estos biomarcadores se investigaron en muestras de sangre materna, de cordón umbilical así como muestras de placenta en el caso de los aductos y de expresión de genes de metabolismo. Los biomarcadores de exposición se correlacionaron con los hábitos de vida y de alimentación de la madre, lugar de residencia, peso y valoración de Apgar mediante análisis de regresión múltiple y multivariados así como de componentes principales que permitieron identificar a los biomarcadores más sensibles para estimar el impacto potencial de la exposición gestacional en la salud del recién nacido.

#### *Determinación de aductos en DNA*

La determinación de aductos se realizó mediante la técnica de post-marcaje con fosforo ( $^{32}\text{P}$ )<sup>51</sup>.

De las muestras, 4  $\mu\text{g}$  de DNA fueron evaporados en el DNA110 SpeedVac e incubados toda la noche con 4 $\mu\text{l}$  de una mezcla de 90 mU de MN y 10 mU SPD (Nucleasa Micrococcal y Fosfodiesterasa tipo II de bazo de ternero), y 0.8  $\mu\text{l}$  de buffer de digestión (100 mM de succinato de sodio, pH 6.0; 50 mM cloruro de calcio) a 37°C, esto con la finalidad de digerir de manera total el DNA, dando como resultado nucleótidos 3' monofosfato.

Posteriormente se realizó un enriquecimiento mediante una digestión con la nucleasa P1 para desfosforilar los nucleótidos sin aductos, dejando fosforilados aquellos nucleótidos que poseen aductos. Se agregaron a la mezcla anterior 2.4  $\mu$ l de buffer de acetato de sodio 250 mM, 1.44  $\mu$ l de cloruro de zinc 2 mM y 0.96  $\mu$ l de NP1 (1.25mg/ml) y las muestras se incubaron durante una hora a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición de 1.92  $\mu$ l de Tris base a 0.5 M.

Inmediatamente después, los nucleótidos 3' monofosfato con aductos se marcaron con 50  $\mu$ Ci de [ $\gamma$ -32P] ATP en presencia de 6 U de Polinucleótido cinasa T4 y buffer de cinasa a 1X (50 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM de Cloruro de magnesio y 10 mM de  $\beta$ -Mercaptoetanol). Se incubó la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se aplicó el total de la mezcla en hojas de PEI polietilenoimina-celulosa para cromatografía en capa fina (10 x 20 cms, unida a una membrana de papel filtro Whatman de 10 x 12 cms).

Una vez aplicada la mezcla se corrió la placa cromatográfica en buffer D1 (1.0 M fosfato de sodio, pH 6.0), durante toda la noche en dirección 1 hacia el papel filtro Whatman, se desechó la parte del papel filtro y se cortó la placa después del corrimiento dejándola de 10 cm x 10 cm, se lavaron las placas durante 10 minutos con agua y se dejaron secar. Se corrieron posteriormente las placas en los buffers D2 (3.5 M formato de litio, 8.5 M urea, pH 3.5) y D3 (0.8 M cloruro de litio, 0.5 M Tris, 8.5 M urea, pH 8.0) en sus respectivas direcciones. Finalmente las placas cromatográficas fueron colocadas en cassettes con pantallas y expuestas a película autoradiográfica a -80°C durante tres días. Después de revelar la película, los "spots" de interés fueron recortados y la radioactividad fue medida en el contador de centelleo Multi-purpose scintillation counter LS 6500.

#### Determinación de cotinina en orina

Se realizó la determinación de cotinina (1-metil-3-(2-piridinil)-2-pirrolidinona) en orina, debido a que esta sustancia es un metabolito de la nicotina, sustancia que está presente en el humo del tabaco. La determinación de la concentración en orina de este metabolito se realizó mediante un kit de detección, One Step

Cotinine Test Device, de Certum Diagnostics. Esta prueba es instantánea y determina como positivo a aquellas muestras que presenten concentraciones superiores a 200ng/mL de cotinina, lo que se considera como un fumador activo.

#### *Determinación de biomarcadores de exposición en orinas y sangre de madres gestantes*

Para la determinación de la presencia de hidrocarburos, benceno, metales, aflatoxina y ftalatos y/o sus metabolitos en muestras biológicas se hicieron siguiendo los protocolos establecidos en la Unidad Analítica de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química de la UNAM (USAI), en donde se llevó cabo este análisis dada la amplia experiencia que tiene este grupo en este tipo de determinaciones.

#### *Análisis estadísticos*

Se utilizaron regresiones logísticas para investigar la asociación entre los polimorfismos de riesgo y los niveles de aductos. A la variante silvestre se le adjudica un valor=0, al heterocigota=1 y al homocigota de riesgo=2<sup>1</sup>. Asimismo entre los niveles de aductos y la presencia de partículas e hidrocarburos aromáticos policíclicos o sus metabolitos en los reportes de la RAMA y en las muestras de orina de las madres gestantes. Un modelo de regresión logística multivariada (SPSS, Statistical Package for Social Sciences) se utilizó para determinar el papel de las covariantes de riesgo (contaminantes y sus metabolitos) en asociación con aductos y con los parámetros clínicos del recién nacido. Las diferencias estadísticas serán consideradas significativas cuando  $p < 0.5$ .

#### *Aspectos éticos*

Investigación con riesgo menor al mínimo para la paciente y su hijo, ya que no se realizó ninguna intervención en ellos, las muestras de sangre fueron obtenidas al momento de puncionar para la toma de estudios convencionales o al canalizar la

vena para ingreso a cirugía y la sangre del producto se obtuvo del segmento de cordón que queda unido a la placenta. Los procedimientos se apegaron a las normas éticas, al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y a la Declaración de Helsinki y sus enmiendas.

Se solicitó carta de consentimiento informado a las pacientes que acepten participar.

El consentimiento fue obtenido por dos médicos residentes de la especialidad de ginecología y obstetricia, que primero les hablaron de aspectos generales del protocolo y los objetivos del mismo, en términos que fueron comprendidos por las pacientes, se les invitó a participar indicándoles que su participación consistía en donar dos muestras de sangre de ellas y una muestra de sangre de cordón de su hijo y un pequeño segmento de placenta además de contestar un cuestionario donde preguntamos a cerca de su ocupación, su estado de salud, hábitos personales y lugar de residencia, tabaquismo y exposición a contaminantes. Se les indicó que los riesgos eran mínimos y más bien inherente a la toma de la muestra requerida para su atención médica, también se les informó que no recibirían ninguna compensación económica.

La contribución del estudio es para la población general y en particular la de la zona norte del valle de México, ya que se estudió el nivel de contaminantes y sus metabolitos en los recién nacidos y su asociación con daños a la salud perinatal y la salud o enfermedad en la vida adulta. El estudio tuvo un beneficio mucho mayor al riesgo que puede tener la población.

Para garantizar la confidencialidad de la información las muestras biológicas fueron etiquetadas con las iniciales de la paciente y el numero consecutivo de caso al que corresponde y las muestras de los recién nacidos de la misma manera agregando un guión y la letra -B después de las iniciales de la madre.

Todas las muestras biológicas serán guardadas hasta que el estudio concluya y se tengan las publicaciones, esto es por aproximadamente 3 años, serán utilizadas solo para este estudio y el resguardo se realizará ante la eventual necesidad de repetir algunas de las mediciones. Al término del estudio serán desechadas con

apego a la norma oficial mexicana *NOM-087-ECOL-SSA1-2002* relativa al manejo de residuos biológico-infecciosos, el resguardo de las muestras se realizará en el instituto de investigaciones biomédicas de la UNAM y el responsable del resguardo y el desecho final de las mismas será la Dra. Eugenia Gonsebatt.

La determinación de los biomarcadores será realizada con recursos del instituto de investigaciones biomédicas de la UNAM y buscando el financiamiento de CONACYT.

## **Recursos, financiamiento y factibilidad**

### *Recursos humanos*

2 investigadores responsables, 3 investigadores asociados, 2 residentes de Ginecología y Obstetricia, 1 estudiante de posgrado.

### *Recursos físicos (lugar y condiciones) y materiales*

El Hospital de Ginecología y obstetricia No 3 del centro médico nacional la Raza cuenta con 6 salas de labor y 4 expulsión, 7 quirófanos, laboratorio con los refrigeradores necesarios, tubos para la toma de muestras y recipientes para la toma de orina.

Se dispone también de los laboratorios e instalaciones del Instituto De Investigaciones Biomédica de la UNAM, que cuenta con los materiales para el procesamiento de las muestras y las medidas de seguridad necesarias y el personal autorizado para el manejo de materiales radiactivos.

### *Recursos financieros*

Se solicitarán a CONACYT de la siguiente manera:

Gasto de inversión: 800,000.00 pesos para la compra de equipo como: dos congeladores tipo REVCO de -70°C para la conservación a corto plazo de las muestras de sangre, orina y placenta que se instalará en la (UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS) y otro en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Un tanque de nitrógeno para la conservación de muestras biológicas a largo plazo. Una balanza analítica para reemplazar equipo dañado y un par de computadoras



para el trabajo de campo (UMAE HGO 3 CMN la RAZA IMSS y Biomédicas, UNAM).

Gasto Corriente 2,000, 000 para la compra de reactivos y materiales necesarios para la toma de muestras, análisis de muestras de orina y sangre, reactivos (el fósforo 32 es un reactivo caro) para la determinación de aductos, ensayos de expresión génica, y patrones de metilación. Asimismo se solicitará apoyo para el pago de estipendios para los médicos residentes de especialidad y un pos doctorante que participarán en el estudio y para la asistencia a un congreso internacional.

*Aspectos de bioseguridad.*

El personal que manejó reactivos radiactivos fue personal autorizado por la Comisión Nacional de Energía Atómica (Dr Pavel Petrosyan). Las muestras de sangre se manejaron de acuerdo a los protocolos de seguridad para material biológico y cuando se descarten se hará de acuerdo a los protocolos de bioseguridad establecidos por la Secretaría de Salud.

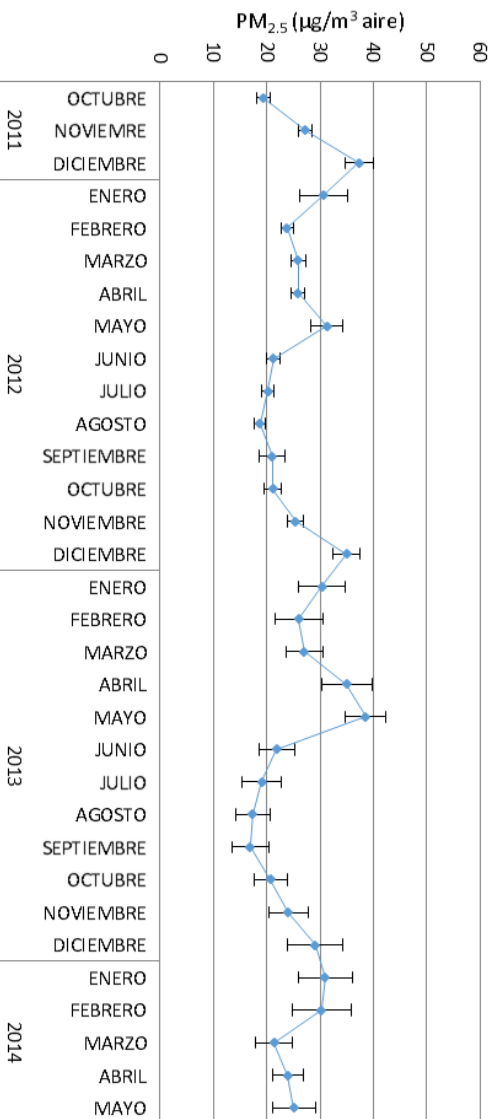
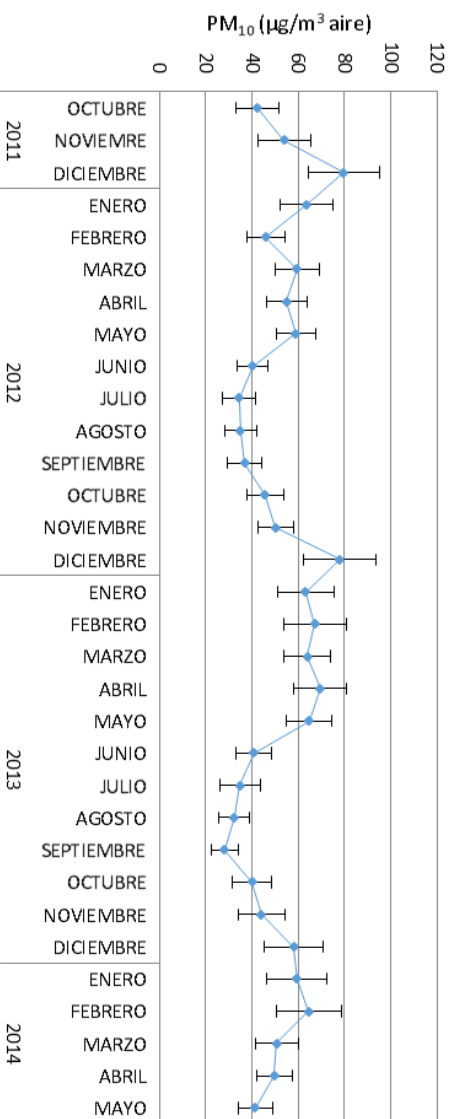
## **8. RESULTADOS**

### *Monitoreo de las concentraciones de PM<sub>2.5</sub> y PM<sub>10</sub> en la ZMCM*

Con datos de la Red Automatizada de Monitoreo Ambiental (RAMA) de la Secretaría de Medio Ambiente del Distrito Federal (SMA), se realizaron los promedios mensuales de PM 10 y PM 2.5 de las estaciones de monitoreo de la zona norte-centro del Distrito Federal.

Para las concentraciones de PM 10 se consideraron las siguientes estaciones de monitoreo: Cuautitlán, Tultitlán, Atizapán, Villa de las Flores, Acolman, San Agustín, Xalostoc, Tlalnepantla, FES Acatlán, Camarones, Hospital General de México, Merced, Cuajimalpa, Santa Fe, Iztacalco y UAM-Iztapalapa. En el caso de las concentraciones de PM 2.5, se consideraron las siguientes estaciones de monitoreo de la RAMA: Camarones, Coyoacán, Merced, Nezahualcóyotl, Hospital General de México, San Agustín, Santa Fe, San Juan de Aragón, Tlalnepantla, UAM-Iztapalapa y Xalostoc.

Para ambos tipos de partículas, se utilizaron los datos de la RAMA, de concentraciones de partículas por hora de los cuales se determinó el promedio mensual. Los datos analizados comprenden del periodo de octubre del 2011 hasta mayo del 2014. Los resultados de PM 10 Y PM 2.5 se pueden ver en la Gráfica 1a y 1b), es posible notar incrementos de PM<sub>10</sub> y PM 2.5 en las épocas secas (octubre-abril) y una disminución de las concentraciones durante las épocas lluviosas (mayo-septiembre). Las disminuciones de PM de deben a la presencia de precipitaciones en la ZMCM, la lluvia provoca un lavado troposférico que precipita al suelo las partículas suspendidas, lo cual se ve reflejado en los niveles de PM.



Grafica 1: Niveles de PM en la ZMCM durante el último trimestre del 2011, la totalidad del 2012-2013 y el primer cuatrimestre del 2014. a) Concentraciones de PM10 (partículas inferiores a 10µm) b) concentraciones de PM2.5 (partículas inferiores a 2.5µm). Los datos representan los promedios mensuales obtenidos de las concentraciones por hora de la RAMA. Datos ± desviación estándar.

### *Determinación de cotinina en orina*

Se llevó a cabo la determinación de las concentraciones de cotinina debido a que es un metabolito de la nicotina presente en el humo de tabaco. Estas determinaciones funcionan como un biomarcador de exposición al humo del tabaco; debido a que en éste estudio sólo queremos evaluar el efecto de la exposición ambiental a PM; la presencia de tabaquismo (activo o pasivo) sería una variable confusora que limitaría los alcances del estudio ya que veríamos los efectos de la exposición al humo del tabaco y no de la exposición a PM.

Se realizaron determinaciones de cotinina en orina en 68 muestras, de las cuales todas (68/68) han resultado negativas ( $>200\text{ng/mL}$  cotinina), lo cual es un buen indicador de la efectividad del cuestionario y la aplicación de los criterios de inclusión/exclusión, los procesos de encuesta y selección son efectivos.

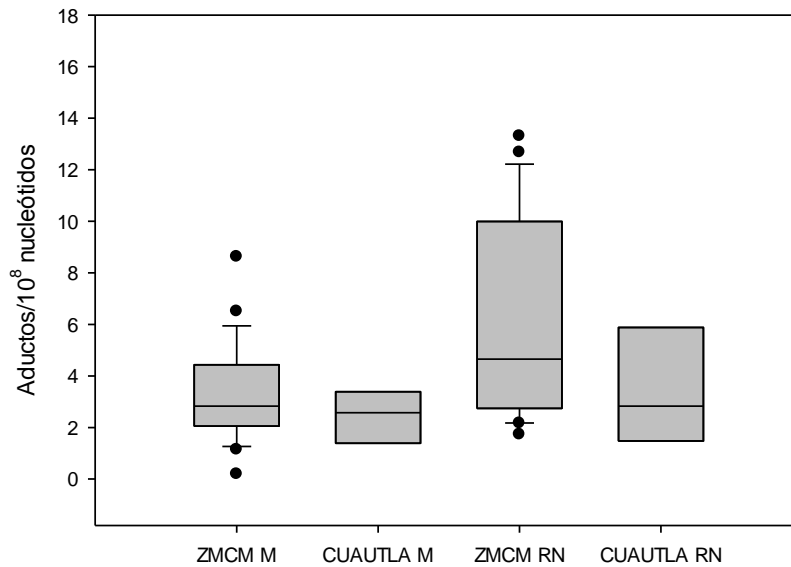
### *Determinación de los niveles de aductos en el DNA*

Una vez analizadas las muestras para la prueba de cotinina, se realizó la determinación de los niveles de aductos en el DNA en una muestra pequeña ( $n=23$ ) de la población que se tiene, y además se analizaron muestras provenientes de la ciudad de Cuautla, Morelos ( $n=4$ ), las cuales provienen de una zona menos contaminada comparada con la ZMCM.

Para el año 2008, las concentraciones de PM 10 en la ZMCM y el estado de Morelos fueron de 24, 296 toneladas/año y 2, 711 toneladas/año, respectivamente. Y de la misma manera, para PM 2.5 los niveles fueron de 5, 499 toneladas/año y 2, 363 toneladas/año. Estos datos nos indican las diferencias de concentración de partículas entre ambos sitios y las probables variaciones de daño en el DNA que se podrían presentar en las madres residentes de ambas zonas urbanas.

Los niveles de aductos en el DNA de las madres fueron inferiores en ambas zonas urbanas (ZMCM y Cuautla), al ser comparados con los encontrados en los recién nacidos (Gráfica 2). Sin embargo, los niveles de daño entre las madres-recién nacidos de ambas zonas urbanas difieren, siendo más alto el daño en los pares de la ZMCM. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en otras investigaciones, en donde los recién nacidos poseen en la mayoría de las ocasiones, niveles de daño más alto que sus madres. Estos niveles de daño se explican por la susceptibilidad del recién nacido durante el desarrollo fetal a la exposición a agentes químicos como los PAH. Además, como se ha documentado en la literatura, los niveles de aductos tienen relación con los niveles de PM a los que se puede estar expuesto, razón por la cual se reportan niveles de daño más altos en la ZMCM comparados con la ciudad de Cuautla, Morelos para las madres y los recién nacidos. En la ZMCM, los niveles de PM y por lo tanto de daño, podrían incrementar el riesgo para sus habitantes a desarrollar ciertas enfermedades relacionadas con la exposición a contaminantes atmosféricos y en mayor medida para grupos más susceptibles, como los recién nacidos.

Los niveles de aductos en el DNA en el grupo de estudio de la ZMCM, se esperaba que fueran marcadamente superiores (con diferencias significativas) a los encontrados en la ciudad de Cuautla, Morelos, esto debido a las concentraciones de PM para ambos sitios. Sin embargo, es importante considerar que el número de muestras analizadas es reducido y los resultados mostrados podrían variar. Por lo tanto, al incrementar el número de muestras analizadas, los niveles de daño en la ZMCM podrían ser superiores, se espera que al analizar los niveles de aductos de los 150 pares madre-recién nacido, se tengan resultados más precisos sobre los niveles de daño.

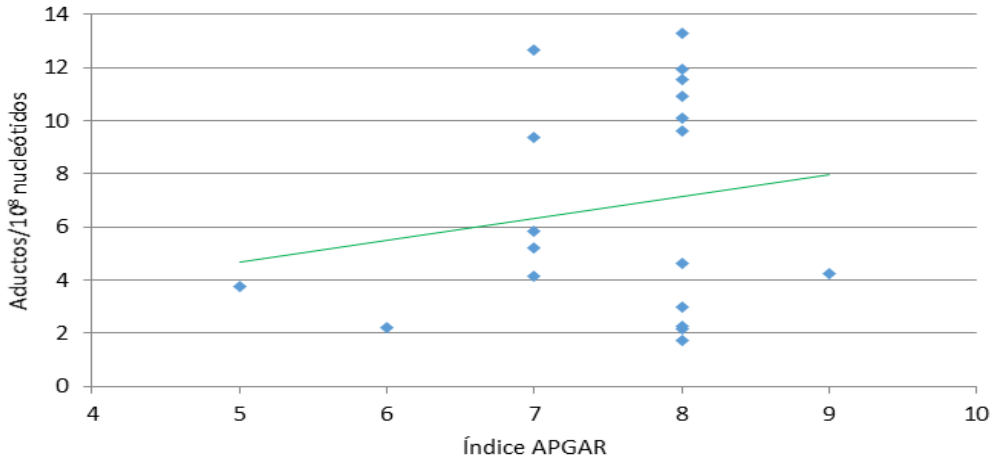
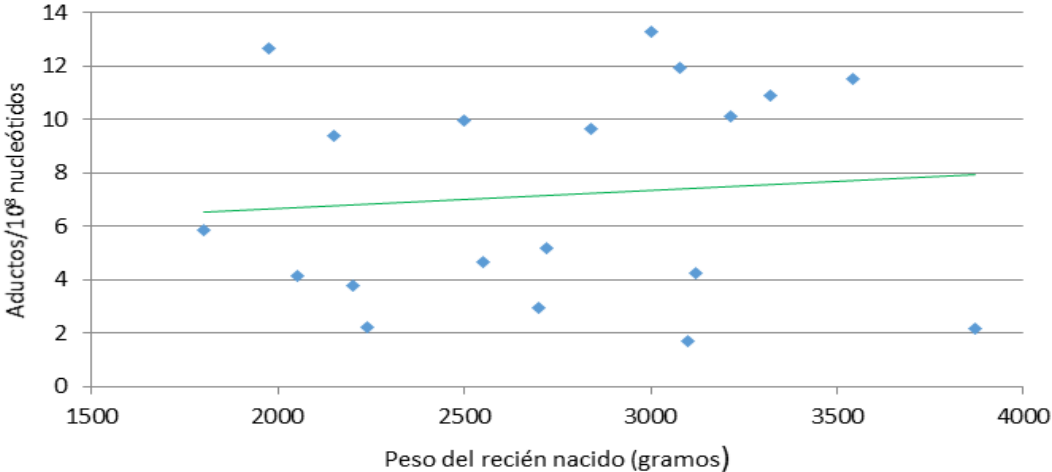


Gráfica 2: Niveles de aductos en el DNA de sangre de madres-recién nacido de la ciudad de Cuautla, Morelos y la ZMCM determinados por <sup>32</sup>P-Postlabling. M=Madre, RN=Recién nacido. Grupo ZMCM n=23; Grupo Cuautla n=4

### *Correlación entre niveles de los aductos con el peso al nacimiento e índice APGAR*

Durante el año 2012, las mismas entidades participantes (IIB-UNAM, UMAE-HGO 3), realizaron un estudio piloto en donde se analizaron los niveles de aductos en madres-recién nacidos expuestos a PM en la ZMCM durante el año 2012 (n=19). Tales datos fueron comparados con el peso del recién nacido y el índice APGAR para ver si existe alguna correlación entre estos parámetros del recién nacido y los niveles de daño. Al realizar una correlación de Pearson, los resultados no muestran ninguna correlación significativa entre los niveles de aductos y el peso del recién nacido (Gráfica 3a;  $R=0.182$ ,  $P>0.05$ ). De la misma manera, no es posible apreciar alguna correlación entre los niveles de aductos y el índice APGAR, al realizar una correlación de Spearman (Gráfica 3b;  $\rho=0.0333$ ,  $P>0.05$ ). Es probable que los resultados obtenidos no muestren una clara correlación,

debido al reducido tamaño muestral. Es necesario realizar estos análisis cuando se tengan los resultados de los 150 pares madre-recién nacido que se tienen contemplados, para tener correlaciones más certeras en caso de que existan.



Gráfica 3: a) Correlación entre los niveles de aductos en el DNA de cordón umbilical de recién nacidos expuestos a PM en la ZMCM y el peso al nacimiento. b) Correlación entre los niveles de aductos en el DNA de recién nacidos y el índice APGAR determinado a momento del nacimiento.

N=19 muestras.

## 9. *DISCUSIÓN*

De acuerdo a la descripción de la Secretaría de Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal en 2008, la ZMCM abarca una superficie de 7,732 km<sup>2</sup>, de la que el 19% lo cubre el Distrito Federal y el 81% restante, el Estado de México; posee una altitud promedio de 2240 metros sobre el nivel del mar y región montañosa comprendida en el Sistema Neovolcánico Transversal.

La altitud en la que se encuentra la ZMCM ocasiona que los procesos de combustión sean deficientes y por lo tanto sean emitidas mayores cantidades de contaminantes debido a una concentración de oxígeno 23% menor a la que se puede encontrar al nivel del mar; la posición latitudinal es otro factor involucrado en la generación de contaminantes, ya que la radiación solar al ser intensa acelera la formación fotoquímica de contaminantes atmosféricos; sumado a esto, las cadenas montañosas que rodean a la ZMCM no permiten el libre flujo de corrientes de aire que desplacen los contaminantes. Además, la gran afluencia vehicular y fuentes fijas generadoras de partículas y contaminantes favorecen la presencia de material particulado (PM) y contaminantes en la ZMCM.

Se ha visto que uno de los principales componentes del material particulado presente en la ZMCM, es el carbono elemental (EC) y el carbono orgánico (OC), este último en mayor proporción. Dentro del OC están una serie de compuestos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), nitrosaminas y aminas aromáticas, los cuales tienen una enorme relevancia porque estos compuestos carbonados pueden llegar a ser muy dañinos ya que son agentes mutagénicos y carcinogénicos, además de tener efectos adversos en la salud.<sup>44</sup>

La exposición in útero a PM, se ha estudiado mediante la evaluación de diversos biomarcadores de exposición. Dentro de los más importantes podemos destacar el análisis de aductos en el DNA, considerados como eventos primarios en el



proceso de la carcinogénesis química, ya que pueden inducir mutaciones en el DNA y promover progreso hacia la formación de una neoplasia. <sup>39</sup>

Si bien se conocen los efectos tóxicos del material particulado, en México no se ha documentado el efecto de los mismos, por lo que surgió el proyecto de investigación. La Ciudad de México es un centro urbano densamente poblado, con gran actividad industrial, lo que provoca grandes emisiones de contaminantes a la atmósfera, incluyendo al material particulado (PM). Asimismo, el feto tiene un mayor riesgo al estar expuesto a contaminantes ambientales, y debido a la mayor absorción, la acumulación de sustancias químicas en el feto, la incapacidad de hígado fetal para metabolizar y eliminar toxinas de manera eficiente, la inmadurez de los procesos de reparación del DNA y una alta tasa de proliferación celular se observan niveles altos de aductos en el DNA en el feto, en función de la concentración estacional de PM en la ZMCM.

Una vez estimada la presencia de aductos o adiciones en el DNA, se estima la formación de aductos “bulky” o “abultados” que deforman la hélice del DNA. Este tipo de daño, cuando es detectado, es reparado por las enzimas de la vía de reparación de nucleótidos o vía NER (nucleotide excision repair). Dentro de esta vía, hemos encontrado que la enzima ERCC2 se encuentra inducida en un modelo murino de exposición a partículas de la ZMCM<sup>44</sup>. Por lo que se considera relevante investigar los niveles de transcritos de mRNA en las muestras de tejidos pendientes de analizar en este estudio, así como la presencia de la variante genética ERCC2 (rs13181), puesto que su presencia ha sido asociada con mayores niveles de aductos en DNA.

La modificación epigenética más importante es la metilación en di nucleótidos CpG que define regiones DMR, las cuales son específicas para cada alelo parental. La exposición gestacional puede causar alteraciones en las DMR que se han asociado a enfermedad, por lo tanto es la segunda fase de este estudio.

Actualmente con los resultados obtenidos, se corroboran las descripciones de artículos previos en cuanto a la época estacional en que se presenta mayor cantidad de material particulado, la mayor cantidad de aductos de los fetos de la ZMCM, así como la utilidad del uso de la prueba de cotinina como método confirmatorio de que la adecuada selección de la muestra, ya que como mencionamos es de vital importancia descartar que de encontrarse alguna modificación importante en la secuencia de DNA ésta no sea a causa del efecto directo del tabaquismo, sino de la contaminación ambiental.

Es necesario continuar la recolección de muestras de forma semanal para de ésta forma abarcar todos los meses del año y seguir la comparación de PM. Actualmente se cuenta con un total de 70, en espera de llevar a cabo las siguientes determinaciones que nos podrían hablar del tipo específico de daño al DNA así como su efecto perinatal, y el riesgo de presentar en un futuro diferentes patologías crónicas degenerativas.

## **10. CONCLUSIONES**

- Se corroboró la mayor concentración de material particulado medido en el ambiente en la época seca.
- Se comprobó la mayor cantidad de aductos presentes en el ADN de los fetos con respecto al encontrado en sus madres; así como la mayor concentración de los mismos en los fetos de la zona metropolitana de la Ciudad de México.
- Es necesario realizar el resto de toma de muestras y su análisis para tener correlaciones más certeras en cuanto al impacto en la salud peri y posnatal.

## 11. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Primer año			Segundo año			Tercer año		
1er Cuat	2do Cuat	3er Cuat	1er Cuat	2do Cuat	3er Cuat	1er Cuat	2do Cuat	3er Cuat
Toma de muestras de sangre, orina y placenta							Análisis de datos para la redacción de informes y manuscritos para tesis de doctorado	
Biomarcadores de efecto temprano: aislamiento de DNA, RNA, análisis de expresión génica, polimorfismos de riesgo, y de patrones de metilación.								
	Biomarcadores de exposición: análisis de muestras de sangre y orina							
Registro de emisiones a través de la RAMA								
					Evaluación preliminar de datos			

## 12. REFERENCIAS

1. García-Suástegui WA, Huerta-Chagoya A, Carrasco-Colín KL, Pratt MM, John K, Petrosyan P, Rubio J, Poirier M, Gonsebatt ME. Seasonal variations in the levels of PAH-DNA adducts in young adults living in Mexico City. *Mutagenesis*. 2011; 26:395-391.
2. Hales CN and Baker D.J.P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetología*. 1992; 35:595-601.
3. Barker DJP, Godfrey KM, Gluckman PD, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *The Lancet*. 1993; 341:938-941.
4. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. *Bioessays*. 2007; 29:145-154.
5. Swanson JM, Entringer S, Buss C, Wadhwaet PD. Developmental origins of health and disease: environmental exposures. *Semin Reprod Med*. 2009; 27:391–402.
6. Herrmann M., King K., Weitzman M. Prenatal tobacco smoke and postnatal secondhand smoke exposure and child neurodevelopment. *Current opinion in pediatrics*. 2008; 20:184-190.
7. Neuman RJ, Lobos E, Reich W, Henderson CA, Sun L-W, Todd RD. Prenatal smoking exposure and dopaminergic genotypes interact to cause a severe ADHD subtype. *Biological Psychiatry*. 2007; 61:1320-1328.
8. Kloog I, Coull BA, Zanobetti A, Koutrakis P, Schwartz JD. Acute and chronic effects of particles on hospital admissions in New-England. *PLoS ONE* 7: e34664. doi:10.1371/journal.pone.0034664.
9. Bell ML., Ebisu K, Peng RD, Dominici F. Adverse health effects of particulate air pollution: modification by air conditioning. *Epidemiology*. 2009; 20:682-686.

10. Pilsner JR, Hu H, Ettinge A, Sánchez BN, Wright RO, Cantonwine D, Lazarus A, Lamadrid-Figueroa H, Mercado-García A, Téllez-Rojo MM, Hernández-Avila M. Influence of prenatal lead exposure on genomic methylation of cord blood DNA. *Environ Health Persp.* 2009; 117:1466-1471.
11. Calderon J, Navarro ME, Jimenez-Capdeville ME, Exposure to arsenic and lead and neuropsychological development in Mexican children. *Environ Res.* 2001; 85: 69–76.
12. Schnaas L., Rothenberg S.J., Flores M.F., Martinez S, Hernandez C, Osorio E, Ruiz Velasco S, Perroni E. Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. *Environmental Health Perspectives*, 2006; 114:791-797.
13. Disponible en: <http://www.insp.mx/centros/salud-poblacional/de-interes/lim-en-accion.html> ultima fecha de acceso 30-03-2013
14. Jirtle R.L. and Skinner M.K. Environmental epigenomics and disease susceptibility *Nature reviews genetics.* 2007; 8:253-62.
15. Secretaría del Medio Ambiente (SMA), Inventario de emisiones de contaminantes tóxicos (2006-10) Programas de Calidad del Aire e Inventario de Emisiones. ([http://www.sma.df.gob.mx/inventario\\_emisiones/index.php?op5pub#](http://www.sma.df.gob.mx/inventario_emisiones/index.php?op5pub#)) última fecha de acceso 30-03-2013.
16. Hrelia P, Maffei F, Angelini S, Forti GC. A molecular epidemiological approach to health risk assessment of urban air pollution. *Toxicology letters.* 2004; 149:261–267.
17. Cascorbi I, Brockmüller J, Roots I. A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility. *Cancer Res.* 1996; 56:4965-4969.

18. Szyfter K, Szymeja Z, Szyfter W. Analysis of the DNA adducts in patients with laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol.* 1993; 47:496-501.
19. Gustavsson P, Jakobsson R, Johansson H, Lewin F, Norel S, Rutkvist LE. Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx, and oesophagus: a case-control study in Sweden. *Occup Environ Med.* 1998; 55:393-400.
20. Brook R.D., Franklin B., Cascio W. Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SD Jr, Tager I. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation.* 2004;109:2655-2671.
21. Romieu I, Borja Aburto V. Particulate air pollution and daily mortality: can results be generalized to Latin American countries?. *Salud Pub. Mex.* 1997; 39: 403-411.
22. García-Suástegui WA, Huerta-Chagoya A, Pratt MM, John K, Petrosyan P, Rubio J, Poirier M, Gonsebatt ME., et. al., En: G. C. Bandeira and H. E. Meneses Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry, Occurrence and Health Issues, Nova Science Publishers, Inc, N.Y., USA 2013, en prensa ISBN: 978-1-62257-473-5.
23. Espinosa-Aguirre JJ, Reyes RE, Rubio J, Ostrosky-Wegman P. Martínez G. Mutagenic activity of urban air samples and its modulation by chili extracts. *Mutat Res.* 1993; 303:55-61.
24. Valverde M, López MC, López I, Sánchez I, Fortoul TI, Ostrosky-Wegman P, Rojas E. DNA damage in leukocytes and buccal and nasal epithelial cells of individuals exposed to air pollution in Mexico City. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 30:147-152.
25. Rojas E, Valverde M, Lopez MC, Naufalb I, Sanchez I, Bizarro P, Lopez I, Fortoul TI, Ostrosky-Wegman P. Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct

epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 2000; 468:11-17.

26. Montero R, Serrano L, Dávila V Segura Y, Arrieta A, Fuentes R, Abad I, Valencia L, Sierra P, Camacho R. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ Mol Mutagen.*; 2003; 42:216-222. Erratum in: *Environ Mol Mutagen.* 2004.

27. Gutiérrez-Castillo ME, Roubicek DA, Cebrián-García ME, De Vizcaya-Ruiz A, Sordo-Cedeño M, Ostrosky-Wegman P. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ Mol Mutagen.* 2006; 47:199-211.

28. Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P. et al. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat Res.* 2007; 631:9-15.

29. Montero R, Araujo A, Carranza P, Mejía-Loza V, Serrano L, Albores A, Salinas JE, Camacho-Carranz R. Genotype frequencies of polymorphic GSTM1, GSTT1, and cytochrome P450 CYP1A1 in Mexicans. *Hum Biol.* 2007; 79:299-312.

30. Pérez-Morales R, Castro-Hernández C, Gonsebatt ME, Rubio J. Polymorphism of CYP1A1\*2C, GSTM1\*0, and GSTT1\*0 in a Mexican Mestizo population: a similitude analysis. *Hum Biol.* 2008, 70:457-465.

31. Hudson R, Arriola A, Martínez-Gómez M, Distel H. Effect of air pollution on olfactory function in residents of Mexico City. *Chem Senses.* 2006, 31:79-85.

32. Guarneros M, Hummel T, Martínez-Gómez M, Hudson R. Mexico City air pollution adversely affects olfactory function and intranasal trigeminal sensitivity. *Chem Senses.* 2009; 34:819-26.

33. Téllez-Rojo MM, Romieu I, Polo-Peña M, Ruiz-Velasco S, Meneses-González F, Hernández-Avila M. Efecto de la contaminación ambiental sobre las consultas



por infecciones respiratorias en niños de la Ciudad de México. *Salud Publica Mex.* 1997; 39:403-411.

34. Ribas-Fitó N, Torrent M, Carrizo D, Muñoz-Ortiz L, Júlvez J, Grimalt JO, Sunyer J. In utero exposure to background concentrations of DDT and cognitive functioning among preschoolers. *American J. of Epidemiology.* 2006; 164:955-962.

35. Cupul-Uicab LA, Hernández-Ávila M, Terrazas-Medina EA, Pennell ML, Longnecker MP. Prenatal exposure to the major DDT metabolite 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and growth in boys from Mexico. *Environmental Research.* 2010; Aug 595-603.

36. Meeker JD, Johnson PI, Camann D, Hauser R. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) concentrations in house dust are related to hormone levels in men. *Science of the Total Environment.* 2009; 407:3425-3429.

37. NORMA Oficial Mexicana NOM-133-ECOL-2000, Protección ambiental-Bifenilos, policlorados (BPC's)-Especificaciones de manejo. *Diario Oficial* 10 de Diciembre 2001.

38. Perera F, Herbstman J. Prenatal environmental epigenetics and disease. *Reproductive Toxicology.* 2011; 31:363-373.

39. Poirier MC. Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4:630–637.

40. Hemminki K. DNA adducts in biomonitoring. *Toxicology Letters.* 1995; 77:227-229.

41. Georgiadis P, Demopoulos NA, Topinka J, Stephanou G, Stoikidou M, Bekyrou M, Katsouyianni K, Sram R, Autrup H, Kyrtopoulos SA. Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. *Toxicol Lett.* 2004; 149:69-280.

42. Pavanello S, Pulliero A, Siwinska E, Mielzynska D, Clonfero E. Reduced nucleotide excision repair and GSTM1-null genotypes influence anti-B[a]PDE-DNA adduct levels in mononuclear white blood cells of highly PAH-exposed coke oven workers. *Carcinogenesis*. 2005; 25:169-175.
43. Palli D, Masala G, Peluso M, Gaspari L, Krogh V, Munnia A, Panico S, Saieva C, Tumino R, Vineis P, Garte S. The effects of diet on DNA bulky adduct levels are strongly modified by GSTM1 genotype: a study on 634 subjects. *Carcinogenesis*. 2004; 25:577-584.
44. Maciel Ruiz, J. Inducción de Aductos por partículas ambientales en pulmón de rata. Tesis de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, 2013.
45. Zhao H, Wang L-E, Li D, Chamberlain RM, Sturgis EM, Wei Q. Genotypes and haplotypes of ERCC1 and ERCC2/XPD genes predict levels of benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA adducts in cultured primary lymphocytes from healthy individuals: a genotype-phenotype correlation analysis. *Carcinogenesis*. 2008; 29:1560-1566.
46. Bens S, Haake A, Richter J, Lehold J, Kolarova J, Vater I, Riepe FG, Buiting K, Eggermann T, Gillissen-Kaesbach G, Platzer K, Prawitt D, Caliebe A, Siebert R. Frequency and characterization of DNA methylation defects in children born SGA. *Eur J Hum Genet*. 2012; (12 December 2012) doi:10.1038/ejhg.2012.262.
47. Quantitative Differentially Methylated Regions QDMR (<http://bioinfo.hrbbmu.edu.cn/qdmr>) ultima fecha de acceso 12/06=2013.
48. Lim AL, Ng S, Leow SCP, Choo R, Ito M, Chan YH, Goh SK, Tng E, Kwek K, Chong YS, Gluckman PD, Ferguson-Smith AC. Epigenetic state and expression of imprinted genes in umbilical cord correlates with growth parameters in human pregnancy. *J Med Genet*. 2012; 49: 689-97.
49. Veloz Martínez et al., 2013 en preparación.

50. Zhar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis 4th Ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA. 386 pp.
51. Soriano O, Delgado M, Anguiano O, Petrosian P, Molina-Servín E, Gonsebatt ME, Aceves C. Antineoplastic effect of iodine and iodide in DMBA-induced mammary tumors. Association between lactoperoxidase and estrogen-adduct production. *Endocrine-Related Cancer*. 2011;18:529-539.
52. Valdovinos-Flores, C. and Gonsebatt. Nerve growth factor (NGF) exhibits an antioxidant and an autocrine activity in mouse liver that is modulated by buthionine sulfoximine, arsenic and acetaminophen. *Free Radic Res*. 2013; 47:407-412.
53. Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki J, Clark S. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*. 2002; 27:101–110.
54. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239:487-491.
55. Murphy SK, Huang Z, Hoyo C. Differentially methylated regions of imprinted genes in prenatal, perinatal and postnatal human tissues. *PLoS ONE*. 2012; E 7: e40924. doi:10.1371/journal.pone.0040924.
56. Singal R, Ferdinand L, Reis IM, Schlesselman JJ. Methylation of multiple genes in prostate cancer and the relationship with clinicopathological features of disease. *Oncol Rep*. 2004; 12:631-637.
57. GenPoP Disponible en (<http://genepop.curtin.edu.au>) última fecha de acceso 30-03-2013.
58. Rana, S. V. S. 2006. *Environmental Pollution: Health and Toxicology*, First edition, Alpha Science International Ltd., Oxford, United Kingdom, 12-13 p

### 13. ANEXOS



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN TITULADO

“BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN GESTACIONAL A CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MÉXICO (ZMCM) Y SU ASOCIACIÓN CON SALUD PERI Y POSNATAL”

El estudio será patrocinado por el Consejo Nacional de ciencia y tecnología

México D.F. A \_\_\_\_\_ DE \_\_\_\_\_ DEL AÑO \_\_\_\_\_

Número de registro: \_\_\_\_\_

**Justificación del estudio:** En el Valle de México se ha reportado una emisión aproximada de 450 toneladas por día de hidrocarburos, que es mayor que la reportada para las grandes ciudades de Estados Unidos y Europa. Este tipo de contaminación afecta a toda la población incluidos los bebés que no han nacido. La exposición a contaminación durante de los niños que están en el vientre materno se asocia a una mayor susceptibilidad para desarrollar enfermedades del corazón, obesidad, diabetes y cáncer en la vida adulta. Existen reportes de asociación de los contaminantes con bajo peso al nacimiento, muerte perinatal e incapacidad por daño neurológico. La información que genere este estudio, permitirá estimar el impacto que produce en la salud del recién nacido la contaminación de la zona metropolitana de la ciudad de México.

**El objetivo de este estudio es:**

Determinar la exposición durante el embarazo a agentes tóxicos ambientales en la zona metropolitana de la ciudad de México, mediante la medición de componentes de la contaminación ambiental en orinas y en sangre de mujeres embarazadas, sangre de cordón umbilical y placenta. Esta información se analizará para saber si se relaciona con el peso y talla del recién nacido, bienestar al nacimiento, malformaciones, prematuridad y muerte temprana del recién nacido. Trataremos de identificar a los agentes contaminantes de riesgo.

**Procedimientos:**

Su participación consistirá en donar una muestra de sangre y otra de orina de usted y una vez que su hijo haya nacido y sea entregado al pediatra, permitiremos tomar una muestra de sangre del cordón umbilical que queda unido a la placenta y un pequeño segmento de placenta que se cortará cuando está se haya desechado. Además de contestar un cuestionario donde preguntaremos acerca de su ocupación, su estado de salud, hábitos personales, lugar de residencia, tabaquismo y exposición a contaminantes.

La muestra de sangre y la orina suyas, se tomarán cuando vaya a nacer su bebé, se aprovechará el momento en que le tomen muestras para otro tipo de estudio en el embarazo o cuando le coloquen el suero. **A su bebé no se le tomará ninguna muestra y no será afectado por este estudio**, la sangre será obtenida del segmento de cordón que queda unido a la placenta después del corte del cordón y de entregar a su hijo al pediatra.

La cantidad de sangre de cada muestra es de 10 mililitros, que equivalen a 4 cucharaditas de café, la cantidad de orina es igual que la de sangre. El segmento de placenta será como del tamaño de una nuez y lo cortaremos cuando la placenta ya esté fuera de su matriz y no la ocupen los médicos que le atienden. Todas las muestras serán analizadas en el instituto de investigaciones biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Posibles riesgos y molestias:**

No existen riesgos mayores al participar en este estudio. En la toma de muestra de sangre se puede presentar una mínima incomodidad.

**Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:**

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:

Usted tiene derecho a ser informada, toda la información que requiera sobre el estudio o sobre los resultados de usted y/o su hijo, se le podrá proporcionar con requerirlo directamente al investigador responsable Dra María Guadalupe Veloz Martínez.

Si los niveles de contaminaste fueran anormales, no se dispone de ninguna alternativa de tratamiento para disminuirlos.

Si decide participar, no recibirá ningún pago.

**Participación o retiro:**

Usted puede negarse a participar. Usted puede cambiar de opinión acerca de seguir participando en el estudio y dejarlo aún cuando ya haya empezado. Si nosotros encontramos información importante durante el transcurso de nuestro estudio, esta se le dará a conocer también, aunque ya esté fuera del mismo. Su rechazo a participar o la salida del mismo, no tendrá ningún tipo de repercusión en su atención en esta institución.

Todas las muestras de sangre, orina y placenta, serán guardadas hasta que el estudio concluya y una vez terminado este, serán desechadas de forma especial para no contaminar el medio ambiente, el resguardo de las muestras se realizará en el instituto de investigaciones biomédicas de la UNAM. La responsable del resguardo y el desecho final de las mismas será la Dra. Eugenia Gonsebatt. Si en algún momento usted desea retirar su autorización para el resguardo de las muestras y quiere que estas se eliminen, puede hacerlo con toda libertad y sin ninguna consecuencia por ello.

**Privacidad y confidencialidad:**

Solo los investigadores analizarán toda la información y resultados generados en este estudio. Los datos de la investigación de este estudio serán publicados en revistas científicas pero serán presentados por grupo solamente, para proteger la identidad de los participantes usted será identificado por un número y su nombre no será usado.

**Autorización para la toma de muestras**

Marque con una X su elección

No autoriza que se tome la muestra. (\_\_\_\_)

Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio. (\_\_\_\_)

Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros. (\_\_\_\_)

**Autorización para el resguardo de las muestras**

No autoriza que las muestras se resguarden. (\_\_\_\_)

Si autorizo que las muestras se resguarden hasta el término de este estudio y se utilicen solo para este estudio. (\_\_\_\_)

Si autorizo que las muestras se resguarden hasta el término de este estudio y puedan ser usadas para este estudio y estudios futuros. (\_\_\_\_)

**Beneficios al término del estudio:**

Es posible que usted no se beneficie inmediatamente al participar en este estudio. Si se observa daño en sus células nosotros le haremos saber. Este estudio ayudará a saber el efecto que tienen los componentes de la contaminación ambiental en las células sanguíneas suyas y de su hijo y al analizar sus resultados junto con los de todo el grupo de estudio, permitirá conocer los daños en los recién nacidos de la zona metropolitana del valle de México en general.

**En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:**

Investigador Responsable:

Dra. María Guadalupe Veloz Martínez

División de investigación en salud 6° piso del Hospital De Ginecología Y Obstetricia Del Centro Médico Nacional La Raza IMSS

Domicilio: Seris y Antonio Valeriano SN Col La Raza Tel 57245900 ext. 23768

Correo: [maria.veloz@imss.gob.mx](mailto:maria.veloz@imss.gob.mx)

Colaboradores:

Dra Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM

Domicilio: Calle Belisario Domínguez Número 13, Código Postal: 14070 Colonia San Fernando Delegación Tlalpan, Ciudad de México Teléfono: 555.6229179

e-mail: [margen@unam.mx](mailto:margen@unam.mx)

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a:

Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque “B ” de la Unidad de Congresos, Col. Doctores. México, D.F., CP 06720.

Teléfono (55)

56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: [conise@cis.gob.mx](mailto:conise@cis.gob.mx)

Nombre y firma de la aceptante

Nombre y firma del Cónyuge

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

\_\_\_\_\_

Testigo 1

Nombre y firma \_\_\_\_\_

Relación con el aceptante \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

Testigo 2

Nombre y firma \_\_\_\_\_

Relación con el aceptante \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_

## Cuestionario de salud personal

Por favor, escuche con atención las siguientes preguntas con cuidado y conteste con respuestas detalladas. La información que ofrece no se asociará con su nombre en ningún documento público y será conocido solamente por los investigadores principales encargados de esta investigación. Es posible que las respuestas que ha suministrado puedan tener un efecto directo sobre la interpretación de nuestros resultados. En consecuencia, le pedimos que coopere completamente en suministrar la información correcta. **Gracias.**

1) Nombre completo: \_\_\_\_\_  
Nombre (s)                      apellido Paterno                      apellido materno

Esta página separará del cuestionario y el investigador principal completará lo demás. Solamente el número de código estará como un identificador en las páginas siguientes. Si el espacio suministrado no es suficiente para completar una respuesta, por favor, utilice la parte de atrás de la página e identifique el resto de la respuesta con el número de la pregunta.

### Información Personal

- 2) Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_  
Día/mes /año
- 3) Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_
- 4) Dirección actual ( zona centro, sur, oriente o poniente y tiempo que lleva viviendo ahí ):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

### Información de exposición

- 5) ¿Vive a menos de dos cuadras (200 mts) de una gasolinera o fabrica? \_\_\_\_\_
- 6) ¿A que se dedica? \_\_\_\_\_
- 7) ¿Cuánto tiempo tiene desempeñando esa actividad? \_\_\_\_\_
- 8) ¿Cuántas personas viven en su casa? \_\_\_\_\_
- 9) ¿Cuántas personas fuman en su casa? \_\_\_\_\_
- 10) ¿Se cocina en su casa en anafres? \_\_\_\_\_
- 11) ¿Pasa mucho tiempo con algún fumador? No                      Si ¿Cuántas horas? \_\_\_\_\_
- 12) ¿Usted fuma? No                      , Si                      ¿Cuántos cigarros por día? \_\_\_\_\_
- 13) ¿A que edad empezó a fumar? \_\_\_\_\_
- 14) ¿Cuánto tiempo pasó desde que fumó el ultimo cigarrillo antes de tomar la muestra?  
(minutos, horas, días) \_\_\_\_\_
- 15) ¿Cuánto tiempo (minutos horas) pasó desde que estuvo junto a una persona que estaba fumando \_\_\_\_\_
- 16) En las dos últimas semanas ¿ha estado expuesto(a) a gasolinas, thinner, pinturas,

Aerosoles, humo de leña o carbón? No \_\_\_\_\_ Si ¿Cuál? \_\_\_\_\_

## Historia Médica

17) En las dos últimas semanas ¿cuántos días se quedó en casa por haber estado enfermo(a)?

18) ¿Le han diagnosticado alguna vez una de las siguientes enfermedades?

( ) Bronquitis ( ) Neumonía ( ) Asma ( ) Rinitis alérgica ( ) Alergia de contacto

( ) Otra alergia, cual \_\_\_\_\_

19) Actualmente ¿toma algún medicamento? No \_\_\_\_\_ Si ¿Cuál? \_\_\_\_\_  
¿Desde cuándo y la dosis? \_\_\_\_\_

20) ¿Hay historia de cáncer en su familia? No \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_ Por favor explique \_\_\_\_\_

21) ¿Le causó algún dolor la toma de muestra? \_\_\_\_\_

## Historia Nutricional

22) ¿Es usted vegetariano (a)? No \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_

23) ¿Come usted carne y pescado? No \_\_\_\_\_ Si \_\_\_\_\_

a) Si la respuesta es **Si**, especifique la frecuencia.

	1 a 2 días	3 a 4 días	5 a 6 días	Todos los días
Carne de Res	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pescado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pollo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Cerdo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Embutidos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

24) ¿Cómo prefiere que sea cocinado? Jugoso \_\_\_\_\_ mediano \_\_\_\_\_ bien cocido \_\_\_\_\_ al carbón

25) ¿Toma café? ¿Cuántas tazas por día?

26) ¿Acostumbra ingerir bebidas alcohólicas?

No \_\_\_\_\_ Si ¿con qué frecuencia? \_\_\_\_\_

27) ¿Qué tipo de bebida ingiere?

28) ¿Con que frecuencia come usted frutas y verduras? \_\_\_\_\_

29) ¿Qué tipo de frutas y verduras consume \_\_\_\_\_

## RESULTADOS PERINATALES

Peso \_\_\_\_\_ Talla \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Apgar min \_\_\_\_\_ 5 min \_\_\_\_\_  
Capurro \_\_\_\_\_

Semanas de edad gestacional al nacimiento \_\_\_\_\_



Malformaciones congénitas NO\_\_\_ SI\_\_\_

Cuales\_\_\_\_\_

Nacimiento pretérmino NO\_\_\_ SI\_\_\_

motivo\_\_\_\_\_

A los 28 días de vida extrauterina el recién nacido vive SI\_\_\_ NO\_\_\_ causa de la defunción\_\_\_\_\_

Gracias por su colaboración

### Hoja de recolección de datos biomarcadores

#	#	#	Expresión			Alelos			% metilación			
muestra	Código	aductos	CYP1A1	CYP1B1	ERCC2	CYP1B1	GSTM 1	ERCC 2	IG DMR	H19 DMR	IGF2R DMR	PEG10 DMR

### Hoja de recolección de datos de biomarcadores (continuación)

<b>Pb</b> sangre	<b>Cd</b> orina	<b>Ftalatos</b> orina	<b>Hidroxi-pereno</b> orina	<b>Ácido mucónico</b> orina					
---------------------	--------------------	--------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--	--	--	--	--