



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

RELACIÓN DE LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES  
CON LA PRESENCIA DE XENOBIÓTICOS EN  
LECHE MATERNA

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
Orientación Biología Marina

Presenta

**Patricia Carolina Castillo Castañeda**

La Paz, Baja California Sur, diciembre de 2017

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 8 del Mes de Noviembre del 2017, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Relación de las defensas antioxidantes con la presencia de xenobióticos en leche materna"**

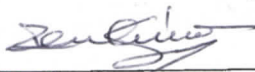
Presentada por el alumno:

**Patricia Carolina Castillo Castañeda**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biología Marina

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

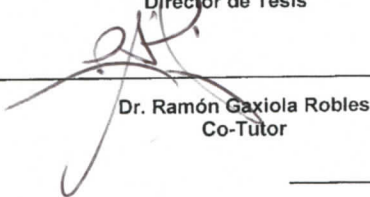
### LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Tania Zenteno Savín  
Director de Tesis



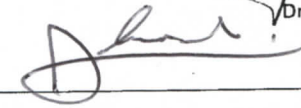
Dra. Lía Ceina Méndez Rodríguez  
Co-Tutor



Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Co-Tutor



Dr. Patricio Barros Núñez  
Co-Tutor



Dr. Adolfo García González  
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

# CONFORMACIÓN DE COMITÉS

## Comité tutorial

Dra. Tania Zenteno Savín  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Director de tesis

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.  
Co-Director de tesis

Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste - Instituto Mexicano del Seguro Social  
Co-tutor

Dr. Patricio Barros Núñez  
Centro Biomédico de Occidente  
Co-tutor

Dr. Adolfo García González  
Instituto Mexicano del Seguro Social  
Co-tutor

## Comité revisor de tesis

Dra. Tania Zenteno Savín  
Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez  
Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Dr. Patricio Barros Núñez  
Dr. Adolfo García González

## Jurado de examen

Dra. Tania Zenteno Savín  
Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez  
Dr. Ramón Gaxiola Robles  
Dr. Patricio Barros Núñez  
Dr. Adolfo García González

## Suplentes

Dra. Elena Palacios Mechetnov  
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

## Resumen

Algunos compuestos xenobióticos procedentes del ambiente y de los alimentos son bioacumulables, y pueden ser liberados en la producción de leche materna. Durante el metabolismo, el organismo produce normalmente especies reactivas de oxígeno (ERO), algunos xenobióticos pueden aumentar esta producción y provocar daño oxidativo en lípidos, proteínas y ADN. Para contrarrestar este daño, se cuenta con un sistema antioxidante presente en leche materna, que consta de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST) y antioxidantes no enzimáticos, como glutatión (GSH). Los procesos de metilación del ADN permiten regular la expresión de genes incluyendo *GSTP1* encargado de producir la enzima GST, la cual interviene en el metabolismo de xenobióticos. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación existente entre la concentración de xenobióticos (plaguicidas organoclorados y elementos traza) y los indicadores de estrés oxidativo presentes en leche materna, así como la influencia de la alimentación, el número de gestas y la actividad de las mujeres sudcalifornianas. El grupo de estudio incluyó 108 mujeres donantes de leche materna en su segunda semana postparto, posteriormente se realizó una toma de muestras de sangre en 34 de las 108 mujeres. Se midió la actividad de las enzimas antioxidantes, el contenido de GSH, así como la concentración de indicadores de daño oxidativo, de xenobióticos y se evaluó el estado de metilación del gen *GSTP1*. Se detectaron 21 plaguicidas, de los cuales el dicloro-difenil-tricloroetano, se detectó en todas las muestras de leche. La concentración de elementos traza considerados tóxicos (arsénico, mercurio, plomo y cadmio) no sobrepasó los límites permisibles establecidos por la OMS y EPA. No se encontró una relación significativa entre ERO y la concentración de xenobióticos. Se observó una baja correlación entre los indicadores de daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, en relación con la concentración de plaguicidas ( $r < 0.40$ ,  $p < 0.05$ ), y elementos traza ( $r < 0.40$ ,  $p < 0.05$ ). Esto sugiere que la actividad antioxidante de SOD, GPx, GST y GR contribuye a neutralizar las ERO y a prevenir el daño oxidativo. La frecuencia de consumo de pescados y mariscos, el número de embarazos y la ocupación, no fueron factores determinantes en el nivel de contaminación de la leche materna ni en la respuesta antioxidante. Se encontró un estado no metilado en el gen *GSTP1* sugiriendo una correcta expresión y participación de GST en los mecanismos de detoxificación y una probabilidad baja de que las mujeres sudcalifornianas desarrollen algún tipo de patología asociada a la metilación del gen *GSTP1*.

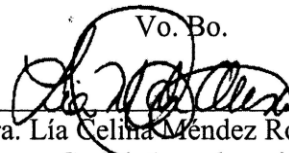
**Palabras clave:** leche materna, antioxidantes, plaguicidas, elementos traza

Vo. Bo.



Dra. Tania Zenteno Savín  
Co-Director de tesis

Vo. Bo.



Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez  
Co-Director de tesis

## Summary

Some xenobiotics from the environment and food are bioaccumulative and can be released in breast milk production. During metabolism, reactive oxygen species (ROS) are produced, xenobiotics can increase this and lead oxidative damage to lipids, proteins and DNA. To counteract this damage, there is an antioxidant system present in breast milk, which consists of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and non-enzymatic antioxidants, such as glutathione (GSH). DNA methylation allow to regulate the expression of genes including *GSTP1* responsible for producing the enzyme GST, which intervenes in the metabolism of xenobiotics. The aim of this study was to evaluate the relationship between the concentration of xenobiotics (organochlorine pesticides and trace elements) and oxidative stress indicators present in breast milk, as well as the influence of diet, the number of pregnancies and the activity of women from Baja California Sur. The study group included 108 women who donated breast milk in their second postpartum week, subsequently blood samples were collected from the women donors of milk. The activity of the antioxidant enzymes, the GSH content, as well as the concentration of indicators of oxidative damage and xenobiotics were measured and the methylation status of the *GSTP1* gene was evaluated. Twenty-one pesticides were detected, of which dichloro-diphenyl-trichloroethane in all milk samples was detected. Toxic trace elements (arsenic, mercury, lead and cadmium) did not exceed the permissible limits established by WHO and EPA. No significant relationship between ROS and xenobiotics was found. A low correlation between the indicators of oxidative damage to lipids, proteins and DNA in relation to the concentration of pesticides ( $r < 0.40$ ,  $p < 0.05$ ), and trace elements ( $r < 0.40$ ,  $p < 0.05$ ) was observed. It is inferred that the antioxidant activity of SOD, GPx, GST and GR helps neutralize ROS and prevent oxidative damage. The frequency of intake of fish and shellfish, the number of pregnancies and occupation, were not determining factors in the level of contamination of breast milk or in the antioxidant response. A non-methylated state in the *GSTP1* gene was found. It is suggested a correct expression and participation of GST in the detoxification mechanisms and a low probability that the women from Baja California Sur develop some type of pathology associated with methylation of *GSTP1*.

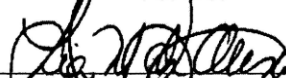
**Key words:** breast milk, antioxidants, pesticides, trace elements

Vo. Bo.



\_\_\_\_\_  
Dra. Tania Zenteno Savín  
Co-Director de tesis

Vo. Bo.



\_\_\_\_\_  
Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez  
Co-Director de tesis

## Dedicatoria

*A mi familia, especialmente a mis niños*

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (377293) que me permitió financiar mis estudios.

Al Centro de Investigación Biológica del Noreste S. C. por permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A mi comité tutorial, a la Dra. Tania Zenteno por su apoyo, su confianza y sobre todo su comprensión y su paciencia en los momentos más difíciles; a la Dra. Lía Méndez por sus consejos y su apoyo, por compartir artículos y apoyarme con la estancia; al Dr. Ramón Gaxiola por su ayuda en estadística y por transmitir su entusiasmo; al Dr. Patricio Barros por su apoyo durante mi estancia y por estar al pendiente; y al Dr. Adolfo García por sus comentarios y sugerencias.

A los técnicos Orlando Lugo y Norma Olgún por su apoyo en el Laboratorio de Estrés Oxidativo y por contribuir con la estandarización de técnicas, que fueron de gran ayuda para realizar este trabajo. También al técnico Baudilio Acosta por su aportación a este trabajo y por su apoyo en el Laboratorio de Absorción Atómica.

Al personal del CIBNOR que siempre brindan sus servicios con amabilidad, especialmente a Horacio Sandoval del Laboratorio de Cómputo, a Tania Núñez de control escolar, al personal de la biblioteca y de las oficinas de posgrado.

A las personas que forman o formaron parte del grupo de estrés oxidativo, por sus consejos, por su amistad y su apoyo en el laboratorio y fuera de él; a Mirna, Roberto, Marcela, Vanessa, Lluvia, Adriana, Raquel, Berenice, Iris, Priscila.

A mis compañeros y amigos del doctorado, gracias por su amistad, y por sus consejos.

A mi familia que siempre me ha apoyado y sin los cuales no hubiera sido posible realizar este posgrado.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	viii
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	8
2.1 Plaguicidas organoclorados .....	8
2.3 Expresión de <i>GSTP1</i> .....	12
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	15
5.1 Objetivo general.....	15
5.2 Objetivos particulares .....	15
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	16
6.1 Grupo de estudio.....	16
6.2 Procesamiento de muestras.....	17
6.3 Antioxidantes enzimáticos.....	17
6.3.1 Superóxido dismutasa .....	17
6.3.2 Catalasa.....	18
6.3.3 Glutación peroxidasa.....	18
6.3.4 Glutación S-transferasa .....	18
6.3.5 Glutación reductasa .....	19
6.4 Antioxidantes no enzimáticos.....	19
6.4.1 Glutación .....	19
6.5 Producción de especies reactivas de oxígeno .....	20
6.5.1 Radical superóxido .....	20



6.6	Indicadores de daño oxidativo .....	20
6.6.1	Daño oxidativo a lípidos .....	20
6.6.2	Daño oxidativo a proteínas .....	21
6.6.3	Daño oxidativo a ADN .....	21
6.7	Determinación de proteínas totales .....	22
6.8	Plaguicidas organoclorados .....	22
6.9	Determinación de elementos traza .....	22
6.10	Detección de metilación del gen <i>GSTP1</i> .....	23
6.11	Métodos estadísticos .....	23
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
7.1	Indicadores de estrés oxidativo .....	26
7.2	Plaguicidas organoclorados .....	30
7.3	Elementos traza .....	38
7.3.1	Modelo lineal generalizado para carbonilos proteicos .....	46
7.4	Daño oxidativo a ADN .....	47
7.5	Evaluación de la metilación del gen <i>GSTP1</i> .....	50
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>52</b>
8.1	Defensas antioxidantes y plaguicidas organoclorados .....	52
8.2	Sistema antioxidante en relación con la presencia de elementos traza .....	59
8.2.1	Arsénico .....	59
8.2.2	Mercurio .....	60
8.2.3	Selenio .....	61
8.2.4	Zinc .....	63
8.2.5	Hierro .....	65
8.2.6	Cobre .....	66
8.2.7	Cadmio .....	67
8.2.8	Plomo .....	69
8.2.9	Carbonilos proteicos e indicadores de estrés oxidativo .....	70
8.3	Daño oxidativo a ADN .....	71
8.4	Metilación del gen <i>GSTP1</i> .....	76
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>79</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>80</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>98</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Reacción de conjugación de glutatión con xenobióticos a través de la actividad de la enzima glutatión S-transferasa .....	13
<b>Figura 2.</b> Frecuencia de plaguicidas organoclorados en muestras de leche materna de mujeres de Baja California Sur.....	31
<b>Figura 3.</b> Puntaje muestral del análisis de componentes principales de la concentración de plaguicidas e indicadores de estrés oxidativo .....	35
<b>Figura 4.</b> Puntajes canónicos para las funciones discriminantes de la concentración de plaguicidas e indicadores de estrés oxidativo .....	36
<b>Figura 5.</b> Puntajes canónicos para las funciones discriminantes de la concentración de plaguicidas e indicadores de estrés oxidativo de mujeres agrupadas de acuerdo al número de gestas.....	37
<b>Figura 6.</b> Puntaje muestral análisis de componentes principales de la concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo .....	42
<b>Figura 7.</b> Puntaje muestral del análisis de componentes principales de la concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo. ....	43
<b>Figura 8.</b> Puntajes canónicos para las funciones discriminantes de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo de acuerdo al número de embarazos.....	44
<b>Figura 9.</b> Puntajes canónicos para las funciones discriminantes de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo de acuerdo al consumo de pescados y mariscos.....	45
<b>Figura 10.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida del gen <i>GSTP1</i> para evaluación de metilación en muestras de leche materna de mujeres de Baja California Sur. ....	50
<b>Figura 11.</b> Electroforesis en gel de poliacrilamida del gen <i>GSTP1</i> para evaluación de metilación en muestras de sangre .....	51
<b>Figura 12.</b> Metabolismo de dicloro difenil tricloroetano.....	53
<b>Figura 13.</b> Sistema antioxidante presente en leche materna .....	57
<b>Figura 14.</b> Dismutación del radical superóxido catalizada por la enzima superóxido dismutasa .....	65
<b>Figura 15.</b> Oxidación de 2'-desoxiguanosina a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina. ....	72
<b>Figura 16.</b> Mecanismo de silenciamiento de genes por metilación, asociada a la represión transcripcional.....	77

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Indicadores de estrés oxidativo en leche materna de mujeres de Baja California Sur .....	27
<b>Tabla II.</b> Comparaciones de los indicadores de estrés oxidativo, por grupos de mujeres de Baja California Sur . .....	28
<b>Tabla III.</b> Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov de la concentración de plaguicidas organoclorados e indicadores de estrés oxidativo en leche materna .....	31
<b>Tabla IV.</b> Concentración de plaguicidas organoclorados en leche materna de mujeres de Baja California Sur.....	32
<b>Tabla V.</b> Coeficientes de correlación de Spearman entre el índice de masa corporal, indicadores de estrés oxidativo, y concentraciones de plaguicidas organoclorados cuantificados en leche materna .....	33
<b>Tabla VI.</b> Cargas factoriales del análisis de componentes principales de las concentraciones de plaguicidas organoclorados e indicadores de estrés oxidativo cuantificados en leche materna.....	34
<b>Tabla VII.</b> Concentraciones de elementos traza cuantificadas en leche materna.....	38
<b>Tabla VIII.</b> Coeficientes de correlación de Spearman entre los indicadores de estrés oxidativo y las concentraciones de elementos traza cuantificados en leche materna .....	39
<b>Tabla IX.</b> Cargas factoriales del análisis de componentes principales de las concentraciones de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo. ....	40
<b>Tabla X.</b> Coeficientes del modelo mínimo ajustado en el análisis del modelo lineal generalizado para la concentración de carbonilos proteicos.....	46
<b>Tabla XI.</b> Niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina como indicador de daño oxidativo al ADN en sangre.....	47
<b>Tabla XII.</b> Coeficientes de correlación de Spearman entre 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y las concentraciones de xenobióticos medidas en sangre y leche. ....	48
<b>Tabla XIII.</b> Valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina de acuerdo con la alimentación, ocupación, número de amalgamas y hábito de fumar de mujeres. ....	49

**Lista de abreviaturas**

ACP	Análisis de componentes principales
AD	Análisis discriminante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
As	Arsénico
Ca	Calcio
CAT	Catalasa
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono
Cd	Cadmio
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
-CH <sub>3</sub>	Grupo metilo
CIBNOR	Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste
Co	Cobalto
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CPs	Componentes principales
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Cu, Zn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
DDE	Dicloro-difenil-etileno
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DNMT	ADN-metiltransferasas
DNPH	2,4-dinitrofenil hidracina
DOF	Diario Oficial de la Federación
DTNB	Ácido 5, '5-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético

EPA	Agencia de Protección Ambiental
ERO	Especies reactivas de oxígeno
Error. Est.	Error estándar
Fe	Hierro
<i>g</i>	Gravedad
GE	Glutación reductasa
gl	Grados de libertad
GLM	Modelo lineal generalizado
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación S-transferasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HCB	Hexaclorobenceno
HCH	Hexaclorociclohexano
HCl	Ácido clorhídrico
Hg	Mercurio
HNO <sub>3</sub>	Ácido nítrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
I	Yodo
IDA	Ingesta diaria aceptable
IMC	Índice de masa corporal
kg m <sup>-2</sup>	Kilogramos por metro cuadrado
Kg	Kilogramos
LD	Límite de detección

L-OOH	Lipoperóxido
M	Molar
m <sup>2</sup>	Metros cuadrados
MDA	Malondialdehído
mg L <sup>-1</sup>	Miligramos por litro
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mn	Manganeso
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
Mo	Molibdeno
N <sub>2</sub>	Nitrógeno gaseoso
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NBT	Nitroazul de tetrazolio
nm	Nanómetro
nMoles	Nanomoles
O <sub>2</sub>	Oxígeno
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superóxido
OGG1	8-oxoguanina glicosilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Fósforo
Pb	Plomo
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
POCs	Plaguicidas organoclorados
Se	Selenio

SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TEP	1, 1, 3,3- tetraetoxipropano
TetraCDD	1, 2, 3, 4-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TriCDD	1, 7, 8 triclorodibenzo-p-dioxina
U mg <sup>-1</sup> prot	Unidades por miligramo de proteína
U mL <sup>-1</sup>	Unidades por mililitro
UDP	Uridina difosfato
Zn	Zinc
°C	Grados centígrados
µg kg <sup>-1</sup>	Microgramos por kilogramo
µg L <sup>-1</sup>	Microgramos por litro
µL	Microlitros
•OH	Radical hidroxilo
8-oxo-dG	8-hidroxí-2'-desoxiguanosina o 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina

## 1. INTRODUCCIÓN

La lactancia materna es un proceso que involucra cambios fisiológicos que inician desde el embarazo (Jones y Spencer, 2007). En el momento del nacimiento del niño, disminuye la concentración de progesterona e incrementa la prolactina, estimulando la producción de la leche, así como el transporte de proteínas, grasas, carbohidratos, sales, anticuerpos y agua, desde el plasma sanguíneo hacia las glándulas productoras de leche (Valdés y Pérez, 1994). Durante este proceso se movilizan reservas corporales de la madre para satisfacer las demandas energéticas del lactante (Fujita *et al.*, 2012). La secreción de la leche se produce por grupos alveolares rodeados por células epiteliales polarizadas, que conforman una gran cantidad de conductos, los cuales a su vez constituyen ramificaciones dentro de la glándula mamaria (McManaman y Neville, 2003). La expulsión de la leche materna se lleva a cabo por la contracción de células mioepiteliales, en respuesta a la oxitocina liberada de la pituitaria, durante la succión del lactante (McManaman y Neville, 2003).

La entrada y transporte de solutos en la glándula mamaria se puede resumir en 5 rutas principales (Linzell y Peaker, 1971). La ruta 1 incluye la secreción de proteínas, oligosacáridos, agua, lactosa, citrato, fosfato y calcio por medio de exocitosis. Los lípidos (principalmente triglicéridos y fosfolípidos) y lipoproteínas, son secretados por la segunda ruta a través de las células epiteliales mamarias; las cuales son capaces de sintetizar y transportar lípidos a través de glóbulos de grasa únicos en la leche materna (McManaman y Neville, 2003). La ruta 3 transporta proteínas de suero como inmunoglobulinas, albumina, transferrina, entre otras, mediante endocitosis, e involucra células alveolares mamarias (Monks y Neville, 2000). Esta ruta transcitótica también permite el transporte de agentes xenobióticos mediante su unión a lipoproteínas (Polyakov *et al.*, 1996). La ruta 4 hace referencia a mecanismos de transporte transcelular desde el torrente sanguíneo a la leche, e incluye el transporte de iones monovalentes y polivalentes (sodio, potasio, cloro), glucosa y aminoácidos (Burnol *et al.*, 1990; Shennan y Peaker, 2000). La ruta 5 incluye transporte paracelular, que puede ser bidireccional, incluye la transferencia de sustancias de bajo peso molecular y solutos macromoleculares, que se transfieren desde la luz alveolar hacia el espacio intersticial. Esta vía está cerrada durante la lactancia en humanos y en la mayoría de



los mamíferos. Sólo las primeras 4 rutas de transporte transcelulares trabajan para transferir solutos a la leche (McManaman y Neville, 2003).

La composición de la leche materna cambia a lo largo del tiempo. Generalmente, la lactancia se divide en tres fases; calostro (5 días postparto), con mayor contenido de leucocitos, proteínas, antioxidantes y microelementos; leche de transición (6-15 días postparto), en la cual incrementa la concentración de lactosa, lípidos y vitaminas, y leche madura (a partir del día 15 postparto), con menor contenido de proteínas y mayor contenido de grasa (Morera Pons *et al.*, 2000). La dieta materna es un factor determinante en la composición de la leche, con una participación fundamental en el desarrollo físico y mental de los lactantes. La leche materna contiene la combinación específica de nutrientes y factores inmunológicos necesarios para los niños (Innis, 2007; Tijerina-Sáenz *et al.*, 2009). Sin embargo, este alimento no es un producto inocuo, la liberación de productos químicos a través de la leche materna puede reflejar el nivel de contaminación ambiental de la población (Anderson y Wolff, 2000; Azeredo *et al.*, 2008). Los compuestos químicos son liberados en la producción de la leche desde el torrente sanguíneo; la concentración de cada sustancia dependerá de su solubilidad (Anderson y Wolff, 2000).

Los seres vivos se encuentran expuestos a una amplia variedad de xenobióticos (sustancias que interactúan con un organismo sin ser uno de sus componentes naturales) (Jiménez y Kuh, 2009). Entre los xenobióticos se incluyen plaguicidas y algunos elementos traza, procedentes de los alimentos, del agua, del aire y del ambiente (Xavier *et al.*, 2004). Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo con su uso, vida media y estructura química. El uso de los plaguicidas puede ser variado; principalmente, se utilizan en la agricultura (85 %) y salud pública (10 %). En función de su vida media, se clasifican en plaguicidas permanentes (tiempo indefinido), persistentes (desde meses hasta 20 años), moderadamente persistentes (1-18 meses) y no persistentes (desde días hasta 2 semanas). Con base en su origen, los plaguicidas pueden clasificarse como naturales (por ejemplo, cafeína) o sintéticos, y con base en su estructura química, pueden clasificarse como organofosforados, organoclorados, carbamatos, tiocarbamatos, piretroides, derivados bipiridilos, derivados del ácido fenoxiacético, derivados cloronitrofenólicos, derivados de triazinas y compuestos inorgánicos (Ramírez y Lacasaña, 2001). Los plaguicidas organoclorados (POCs) son

contaminantes sintéticos persistentes en el ambiente debido a su lenta degradación química, biológica y fotolítica (Ramírez *et al.*, 2003), así como a su capacidad de biomagnificación a través de la cadena trófica (Clarkson, 1995). Los plaguicidas organofosforados se degradan con mayor facilidad y no tienden a almacenarse en el cuerpo, a diferencia de los POCs (Ramírez y Lacasaña, 2001). Los POCs afectan receptores involucrados en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, y pueden disminuir la producción de insulina, afectando la glucólisis e incrementando el riesgo de diabetes tipo II (Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2010).

Algunos compuestos detectados en leche materna son nutrientes necesarios en la dieta, ya sea en pequeñas cantidades para realizar funciones fisiológicas, o actuando como componentes estructurales o cofactores enzimáticos, como es el caso de los elementos traza. Estos microelementos representan <1% de la masa corporal y contribuyen a mantener el sistema inmune, el sistema antioxidante y la expresión génica (Strachan, 2010). Los microelementos que forman parte del grupo de elementos traza esenciales son cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), yodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), níquel (Ni), selenio (Se) y zinc (Zn). Algunos elementos traza participan en funciones biológicas (a muy bajas concentraciones), pero pueden causar efectos tóxicos en los seres vivos (Bánfalvi, 2011). Elementos traza como cadmio (Cd), plomo (Pb), arsénico (As) y mercurio (Hg) pueden formar parte de la cadena trófica y entrar al organismo dependiendo de su especiación, del tipo de dieta y el estado nutricional, provocando toxicidad (Alloway, 2013; R. Gaxiola-Robles *et al.*, 2014; McLaughlin *et al.*, 1999).

Muchos xenobióticos pueden ser bioacumulables debido a su carácter lipofílico (Sonawane, 1995). Algunos contaminantes presentan un incremento en su concentración en los seres vivos, de un nivel trófico al siguiente; esto se atribuye a que los depredadores (incluido el ser humano) tienden a vivir más tiempo, a crecer más lento y a alcanzar un mayor tamaño que sus presas (Newman, 2009). Ello permite una mayor acumulación de algunos contaminantes; en paralelo, un mayor nivel trófico se relaciona con mayor almacenamiento de lípidos, lo que favorece la acumulación de contaminantes lipofílicos (Newman, 2009). Durante la lactancia, se incrementa el transporte de triglicéridos y disminuye la migración de colesterol y lípidos complejos. La concentración de lípidos en la leche depende principalmente de las

enzimas lipasas y de la glándula mamaria. Sin embargo, la composición de lípidos se determina por la dieta de la madre, actual y durante el embarazo, debido al almacén de lípidos en el tejido adiposo (Mena y Milad, 1998; Morera Pons *et al.*, 2000). La migración de lípidos puede favorecer el transporte de contaminantes lipofílicos (Barouki *et al.*, 2015; Mena y Milad, 1998). Algunos de los contaminantes lipofílicos pueden ser antagonistas hormonales o disruptores endócrinos, provocando, entre otras complicaciones, anomalías en el sistema reproductor de la descendencia, y daño en tejidos como el cerebro, hígado, riñones o el sistema inmune (Colborn *et al.*, 1993).

Para evitar alteraciones crónicas, el organismo cuenta con mecanismos detoxificantes (R. Gaxiola-Robles *et al.*, 2014; Halliwell y Gutteridge, 2007), ya sea de biotransformación (donde intervienen algunos antioxidantes), o excreción, entre los cuales se puede mencionar la lactancia (Der Parsehian, 2008). Diversos xenobióticos pueden incrementar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) o afectar la actividad de las enzimas antioxidantes (Ahmed *et al.*, 2000), provocando un desbalance entre moléculas prooxidantes y antioxidantes, induciendo un estado de estrés oxidativo (Sies, 1997). El sistema antioxidante contribuye a evitar o contrarrestar el daño oxidativo. Este sistema puede encontrarse también en leche materna y comprende enzimas antioxidantes, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión S-transferasa (GST) y antioxidantes no enzimáticos, como el tripéptido glutatión (GSH) (Halliwell y Gutteridge, 2007; Hensley y Floyd, 2003).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) (E.C.1.15.1.1) es la proteína encargada de catalizar la reacción de dismutación del anión superóxido, producto del metabolismo celular, y transformarlo en la especie reactiva peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Se han reportado tres tipos de SOD, cuya principal diferencia es el cofactor (manganeso, cobre y zinc, o hierro) utilizado por la enzima, la principal isoforma de SOD encontrada en leche materna es la Mn-SOD (Konigsberg Fainstein y Aguilar-Maldonado, 2008; Lindmark-Månsson y Åkesson, 2000). La catalasa (E.C.1.11.1.6) es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo y actúa eliminando  $H_2O_2$  cuando se genera en gran cantidad. La enzima catalasa tiene el papel de metabolizar al  $H_2O_2$ , generalmente producto de la reacción de SOD, y convertirla en  $H_2O$  y  $O_2$  (Halliwell y Gutteridge, 2007; Mahmoud *et al.*, 2009). La enzima glutatión peroxidasa

(GPx) (EC 1.11.1.9) es una proteína que contiene Se, es una de las principales enzimas que actúan contra el daño oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peróxidos lipídicos (Mahmoud *et al.*, 2009). El mecanismo de acción de GPx consiste en eliminar al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la oxidación de su grupo funcional unido a Se y la posterior reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub>, utilizando glutatión (GSH) como donador de protones, este último se transforma en glutatión oxidado (GSSG) (Halliwell y Gutteridge, 2007). La glutatión reductasa (GR) (EC 1.8.1.7, GR) es una flavoenzima que cataliza la reducción de GSSG a GSH, dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), manteniendo una concentración adecuada de GSH (Ekinci *et al.*, 2013; Halliwell y Gutteridge, 2007). La glutatión S-transferasa (GST) (EC 2.5.1.18) interviene tanto en el sistema antioxidante como en el metabolismo de xenobióticos, a través de la reacción de conjugación con GSH (Halliwell y Gutteridge, 2007). El GSH, es un tripéptido formado por los aminoácidos cisteína, glutamato y glicina, es un tiol no proteico que posee propiedades reductoras y nucleofílicas. Puede existir en forma reducida (GSH) o en forma oxidada (GSSG); dada su importancia, se encuentra en altas concentraciones en todas las células (Ekinci *et al.*, 2013; Konigsberg Fainstein y Aguilar-Maldonado, 2008). El sistema antioxidante presente en leche materna actúa para minimizar el daño oxidativo a moléculas como proteínas, lípidos y ADN. La ruta más común de oxidación proteica se produce por acción de ERO, las cuales atacan principalmente residuos de prolina, lisina, arginina y treonina. Esta oxidación genera semialdehídos, denominados carbonilos proteicos y generalmente es irreversible (Dalle-Donne *et al.*, 2003; Requena *et al.*, 2003). La oxidación lipídica provocada por ERO, genera una serie de reacciones químicas donde se producen peróxidos orgánicos, que a su vez oxidan a otras moléculas (Rangan y Bulkley, 1993). Algunas sustancias tóxicas pueden aumentar la concentración de ERO provocando daño al ADN, como modificación de bases, ruptura de la hebra, y enlaces cruzados ADN-proteína. Uno de los principales efectos de la oxidación a las bases de ADN que se presentan *in vivo* es la 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, también denominada 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina o 8-oxo-dG, que provoca la transversión G: C → T: A, tras la replicación del ADN (Kennedy *et al.*, 2003). La concentración de 8-oxo-dG en el ADN es un mecanismo de mutagénesis inducida por ERO y ha sido utilizada como marcador de carcinogénesis y enfermedades degenerativas; este marcador puede ser afectado por la edad, el cigarro, el

índice de masa corporal y algunas enfermedades como lupus eritematoso sistémico y enfermedades relacionadas con aumentos en la producción de radicales de oxígeno (Mehrdad *et al.*, 2015).

La exposición a sustancias tóxicas presentes en el ambiente se presenta principalmente por tres vías, inhalación, ingestión y absorción cutánea. Los efectos de los xenobióticos pueden variar en función de la dosis y la vía de exposición (Rodríguez, 2009). El metabolismo de xenobióticos se divide en dos etapas. La primera consiste en biotransformación de los contaminantes y es regulada principalmente por enzimas como monooxigenasas de citocromo P450. La segunda etapa, se basa en la conjugación, mediada por enzimas que incluyen a la GST, a uridinadifosfato glucuroniltransferasas (UDP-glucuronosiltransferasas), sulfotransferasas, entre otros (Rodríguez, 2009). Como producto de las reacciones de la primera etapa se pueden generar electrófilos o nucleófilos con características tóxicas o carcinogénicas. Algunos ejemplos son el metabolismo de nitrosaminas, de acetaminofén, tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) y aflatoxinas las cuales son metabolizadas por las enzimas citocromo P450 y cuyos productos son posteriormente eliminados del organismo gracias a reacciones de conjugación con GST (Smith *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2004).

Los procesos de metilación del ADN permiten regular la expresión de genes, ya sea mediante la metilación de genes individuales o de las islas CpG, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes (Mesa-Cornejo *et al.*, 2006; Ordway y Curran, 2002). Por otro lado las *glutathión S-transferasas* son una superfamilia de genes, donde se incluye al gen *GSTP1* (Parl, 2005); alteraciones en su patrón de metilación, pueden afectar los procesos de detoxificación que llevan a cabo estas enzimas (Mesa-Cornejo *et al.*, 2006). Particularmente la inactivación del gen *GSTP1*, se ha relacionado con presencia de carcinomas en cáncer de mama y próstata (Liang *et al.*, 1999; Widschwendter y Jones, 2002).

La presencia de moléculas antioxidantes y detoxificantes puede contribuir a las bajas concentraciones de xenobióticos reportadas, de tal manera que la leche materna no provoca toxicidad aguda en los lactantes (Albert, 1981). La evaluación toxicológica en leche humana es un indicador no invasivo de la contaminación de la población y del ambiente (Der Parsehian, 2008). La valoración del sistema antioxidante y/o detoxificante permite

determinar las defensas presentes en la leche, las cuales contribuyen a mantener la calidad de la leche materna (Picciano, 2001; Zhou *et al.*, 2012).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar el sistema antioxidante en leche materna, así como el estado de metilación del gen *GSTP1*, con relación a la presencia de plaguicidas y elementos traza.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Plaguicidas organoclorados (POCs)

Los plaguicidas organoclorados (POCs) han contribuido a mantener la salud humana mediante el control de enfermedades transmitidas por vectores y la erradicación de plagas en los cultivos. A pesar de sus beneficios, su uso se ha prohibido en países desarrollados desde hace 40 años, y en México desde hace 16 años, debido a diversos reportes sobre problemas reproductivos y neuronales, así como la incidencia de patologías, como diabetes o cáncer, relacionados a la presencia de POCs en seres humanos (Ramírez *et al.*, 2003). En México, se han realizado estudios de evaluación toxicológica en leche materna que reportan principalmente concentraciones y posibles efectos de POCs. Waliszewski (2000) realizó una investigación en Veracruz donde confirma la movilización de POCs a través de todos los compartimentos del cuerpo de la madre, para ser liberados mediante la producción de leche. En su investigación, Waliszewski (2000) reportó una alta concentración de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) ( $0.651 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y de dicloro-difenil-etileno (pp'DDE) ( $3.997 \text{ mg kg}^{-1}$ ) el metabolito de DDT predominante en leche materna (Waliszewski *et al.*, 2001). En estudios posteriores, se encontró mayor concentración de plaguicidas organoclorados (b-hexaclorociclohexano, dieldrín aldrín, heptacloro, DDT y DDE) en leche materna de mujeres provenientes de zonas urbanas, comparadas con mujeres de zonas rurales, se asume que esto se debe al continuo uso de plaguicidas en los hogares (Prado *et al.*, 2004). Para el 2006, más del 30% de las muestras de leche de mujeres de Yucatán, superaban la ingesta diaria aceptable (IDA) establecida por Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) ( $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) en relación a la concentración de POCs (Rodas-Ortíz *et al.*, 2008). En la leche de dichas mujeres yucatecas, el perfil de concentración de plaguicidas fue encontrado en el siguiente orden: DDTs > clordanos > hexacloro ciclohexanos > clorobenceno > ciclodienos (endrín, dieldrín, aldrín) (Rodas-Ortíz *et al.*, 2008). En el estado de Guerrero se reportó un menor contenido de plaguicidas en comparación con investigaciones de años anteriores en otras zonas del país (Chávez-Almazán *et al.*, 2014). Por ello, se asume que la concentración de POCs ha mostrado una

tendencia negativa en la población a partir de la prohibición de su producción y uso en México desde 1991 y ratificada en el 2001 (eliminación: aldrín, hexaclorociclohexanos, clordanos, dieldrín, endriín, heptacloro, hexaclorobenceno, lindano; restricción: DDT) en la Convención de Estocolmo (DOF, 1991; Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los estados del Noroeste de México (Baja California, Sonora, Sinaloa, Chihuahua y Baja California Sur) se han distinguido por sus limitaciones climáticas (clima árido y semiárido), necesidad de riego y la baja calidad del suelo (Villa Rodríguez y Bracamonte Sierra, 2013). A partir del siglo XIX, se realizaron perforaciones acuíferas con la finalidad de expandir la agricultura en Baja California Sur, lo que provocó la sobreexplotación de acuíferos y su salinización (Cariño *et al.*, 2012). Sin embargo, en la actualidad se ha reportado un incremento significativo en la agricultura mediante cultivos intensivos y el recurrente uso de fertilizantes y plaguicidas para protección de los mismos (Villa Rodríguez y Bracamonte Sierra, 2013). Por otra parte, los escurrimientos de los plaguicidas y herbicidas utilizados en las actividades agropecuarias y de las aguas negras, tanto domésticas como industriales, hacia los ríos y mares, principalmente durante la época de lluvias, ha incrementado la contaminación en las zonas costeras (Moreno Casasola, 2008). Se ha documentado el uso de POCs en la península de Baja California para uso agrícola, así como la presencia de POCs en tejidos de mamíferos de la península, pero es escasa la información disponible publicada al respecto (Niño-Torres *et al.*, 2009; Rivera-Rodríguez y Rodríguez-Estrella, 2011; Rivera-Rodríguez *et al.*, 2007; Zúñiga-Violante *et al.*, 2015). Diversos factores, como la edad, índice de masa corporal, alimentación y número de embarazos, se han relacionado con la presencia de POCs en leche materna. La edad de las madres se ha asociado con un aumento en la concentración de POCs presentes en leche materna, presumiblemente por la bioacumulación de plaguicidas en el tejido adiposo de las madres (Chávez-Almazán *et al.*, 2014; Pohl y Tylenda, 2000). Sin embargo, la paridad ha sido correlacionada negativamente con el contenido de POCs en leche, lo que se ha relacionado con la eliminación de contaminantes en cada evento reproductivo y su subsiguiente periodo de lactancia (Shen *et al.*, 2008). El consumo de alimentos de origen animal, preferentemente aquellos con alto contenido graso, se ha asociado con una mayor concentración de POCs en humanos (Azeredo *et al.*, 2008). Aunque algunos alimentos, como los de origen marino (pescados y mariscos), contienen



niveles elevados de moléculas antioxidantes que ayudan a prevenir el daño oxidativo causado por los xenobióticos presentes (Chao *et al.*, 2006; Hamre, 2011; Lien, 2009; Zhang *et al.*, 1993). Algunos de los antioxidantes que se pueden encontrar en alimentos marinos son las vitaminas A y C, cuyas principales funciones son mejorar el sistema inmune, el metabolismo, la respuesta al estrés, entre otras (Corredor y Landines, 2009). Los alimentos marinos también contienen ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, éstos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son esenciales porque el cuerpo humano no puede sintetizarlos y un adecuado equilibrio entre ellos contribuye a mantener una buena salud (Pham-Huy *et al.*, 2008). Otro tipo de antioxidantes presentes en alimentos marinos son los carotenoides, cuyas principales características son proteger células y tejidos del daño oxidativo provocado por ERO (Sowmya y Sachindra, 2012). La vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, es una vitamina liposoluble que se encuentra especialmente en el pescado. Su principal función es proteger contra la oxidación lipídica y puede actuar como antioxidante o modulador específico, encargado de regular la actividad enzimática y la expresión génica (Hamre, 2011). La concentración de moléculas antioxidantes está relacionada con un alto contenido de ácidos grasos insaturados presentes en alimentos marinos y que pueden ser susceptibles a la oxidación (Faramarzi, 2012).

## **2.2 Elementos traza**

Entre los elementos traza se encuentran elementos esenciales, como Fe, Cu, Mn, Zn, Se, Cr y Ni, los cuales desempeñan funciones como cofactores de enzimas, incluyendo glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD). La toxicidad de los elementos traza depende principalmente de su transporte a través de la membrana celular; esto a su vez, se ve afectado por factores como solubilidad, volatilidad, peso molecular (PM) y mecanismos específicos de transporte (Ferrer, 2003). Se ha reportado la detección de elementos traza en leche materna en estudios alrededor del mundo, así como entre la población mexicana (Al-Saleh *et al.*, 2003; Cardoso *et al.*, 2014; Gaxiola-Robles *et al.*, 2014). Al parecer, los principales factores que determinan las variaciones en la concentración de elementos traza

en leche materna son el ambiente y la dieta de las madres (Parr *et al.*, 1991; Vuori *et al.*, 1980). La presencia de elementos traza considerados tóxicos puede incrementar la producción de ERO y llevar a un desbalance entre las moléculas antioxidantes y prooxidantes, induciendo un estado de estrés oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007; Sies, 1997). Algunos autores reportan una relación positiva entre la actividad de ciertas enzimas antioxidantes y la concentración de algunos microelementos esenciales (Se, Cu, Zn) en leche (Al-Awadi y Srikumar, 2000; Dodge *et al.*, 1999).

Las reacciones de Haber-Weiss y Fenton son un posible mecanismo mediante el cual algunos metales pueden contribuir a la generación de ERO. Se ha sugerido que algunos elementos traza, al entrar en contacto con radicales libres, reaccionan generando nuevos radicales, e iniciando una reacción en cadena (Bánfalvi, 2011).

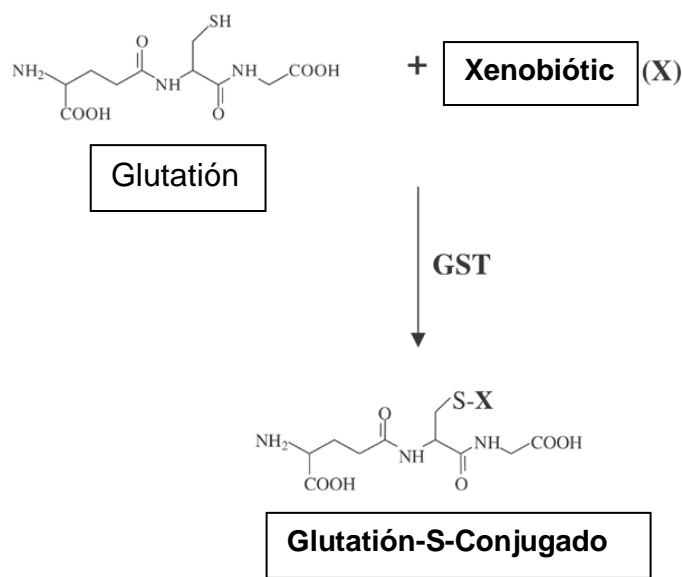


Elementos como el Se interfieren con el metabolismo de otros elementos, como el Hg, disminuyendo su toxicidad e interfiriendo con su presencia (R. Gaxiola-Robles *et al.*, 2014). Otros elementos, como Zn o Cu, además de Se, contribuyen a mitigar el daño oxidativo provocado por los radicales libres, al funcionar como cofactores de enzimas antioxidantes (SOD, GPx) (Halliwell y Gutteridge, 2007).

### 2.3 Expresión de *GSTP1*

La función de la enzima GST está relacionada con el metabolismo de xenobióticos, los cuales son metabolizados mediante una reacción de conjugación con el GSH (Halliwell y Gutteridge, 2007). Las isoformas de GST se han agrupado en siete subfamilias ( $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $\omega$ ,  $\theta$  y  $\zeta$ , de acuerdo a su secuencia y actividad (Hayes y Pulford, 1995). La GST ha sido relacionada con la detoxificación de sustancias cancerígenas, contribuyendo a prevenir diferentes tipos de cáncer (cáncer de mama, pulmón, colon, cerebro, entre otros) (Parl, 2005). Los procesos que regulan la expresión de un gen sin modificar su secuencia nucleotídica son llamados procesos epigenéticos (Cavagnari, 2012). La metilación de ADN es un proceso epigenético cuya función es la regulación de la expresión de los genes mediante el impedimento de la unión de factores de transcripción o la modificación de la estructura de la cromatina (Ordway y Curran, 2002). Las alteraciones en el patrón de metilación de los genes que codifican para las GST afectan la expresión de la enzima y, por ende, los procesos de detoxificación, incrementando la vulnerabilidad a ciertos contaminantes o a sus productos metabólicos. Diversos padecimientos como cáncer de mama, de próstata o gástrico, se han relacionado con alteraciones en los patrones de metilación de GST (Liang *et al.*, 1999; Mesa-Cornejo *et al.*, 2006; Palma, 1998; Widschwendter y Jones, 2002; Wu *et al.*, 2010).

La enzima detoxificante GST interviene en el metabolismo de detoxificación de As y Hg, mediante la reacción de conjugación con GSH; esta reacción de conjugación disminuye la toxicidad de estos elementos favoreciendo su eliminación (Fig. 1).



**Figura 1.** Reacción de conjugación de glutatión con xenobióticos (X) a través de la actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST) dando como resultado la formación de un conjugado de glutatión-S (Townsend y Tew, 2003).

La actividad de las enzimas antioxidantes como SOD, GPx y GST se ha relacionado con presencia de POCs ( $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH) en tumores de mujeres con cáncer de mama (Iscan *et al.*, 2002) ya que aumentan el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica en diversos tejidos (Koner *et al.*, 1998; Sahoo *et al.*, 2000). Los plaguicidas pueden inducir la actividad del grupo de enzimas citocromo P450, que son algunas de las enzimas responsables de incrementar la velocidad de producción de ERO bajo ciertas circunstancias (Parke *et al.*, 1991). Los POCs afectan, así, al ciclo redox, causando daño oxidativo a las macromoléculas incluyendo al ADN (Sierra-Santoyo *et al.*, 2000). Sin embargo, la presencia de enzimas antioxidantes previene el daño oxidativo y funcionan como anticancerígenos, al eliminar a las ERO implicadas en las etapas de iniciación y de promoción de la carcinogénesis. Las GSTs han sido relacionadas con la detoxificación de intermedios electrofílicos, incluyendo peróxidos lipídicos productos de las ERO. Algunos estudios relacionan una mayor actividad de las enzimas antioxidantes en tumores de mujeres con cáncer de mama en comparación con sus controles (Albin *et al.*, 1993; Iscan *et al.*, 2002). Por lo tanto, las enzimas antioxidantes especialmente las GST, juegan un papel importante en la prevención y control del estrés oxidativo provocado por POCs y que a su vez favorece la patogénesis del distintos tipos de

cáncer (Iscan *et al.*, 2002). Ello permite asumir que la metilación de genes destinados a la producción de enzimas antioxidantes puede favorecer un proceso patológico. En particular, se ha asociado la metilación del promotor de *GSTP1* con la inactivación del gen en carcinomas de mujeres con cáncer de mama, lo que permite utilizarlo como biomarcador (Widschwendter y Jones, 2002).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los seres humanos se encuentran expuestos a múltiples xenobióticos (Jiménez y Kuh, 2009), presentes en el ambiente, que pueden ingresar a su organismo principalmente a través de los alimentos. La leche materna, el principal alimento del ser humano durante sus primeros meses de vida (WHO, 2001), también es un mecanismo de detoxificación por parte de las madres, por lo que puede ser una matriz adecuada para estimar el grado de contaminación de la población (Anderson y Wolff, 2000; Tijerina-Sáenz *et al.*, 2009). Principalmente por su contenido de lípidos y proteínas, debido a que algunos contaminantes son lipófilos y otros se unen a proteínas para su transporte (Chao *et al.*, 2014; Chávez-Almazán *et al.*, 2014). Actualmente existe poca información sobre el contenido de xenobióticos en leche materna, en el estado de Baja California Sur. Este estudio permite estimar el grado de contaminación de la población, incluyendo el nivel de contaminantes transferidos a los lactantes.

Sin embargo, las moléculas antioxidantes y el contenido nutrimental reportado en este estudio, justifica y promueve la lactancia materna, además brinda información sobre los factores involucrados, en el posible daño oxidativo de las moléculas presentes en leche materna, que son de importancia para la protección del niño. Los datos obtenidos en este trabajo pueden proveer de información para futuros estudios.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si el sistema antioxidante participa en la detoxificación de xenobióticos, las defensas antioxidantes en leche materna aumentarán con la concentración de plaguicidas y elementos traza.

Si la alimentación, el número de gestas y la actividad de las madres influyen en los niveles de xenobióticos, se encontrará una relación entre estos factores y el sistema antioxidante en leche materna.

Si el estado de metilación del gen *GSTP1*, que codifica para la expresión de la enzima GST, está asociado a la presencia de xenobióticos, se observará metilación del gen *GSTP1* en mujeres con los mayores niveles de xenobióticos.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la relación existente entre la concentración de xenobióticos (plaguicidas y elementos traza) y los indicadores de estrés oxidativo presentes en leche materna, así como la influencia de la alimentación, el número de gestas y la actividad de las madres lactantes sudcalifornianas.

##### **5.2 Objetivos particulares**

1. Determinar la producción de especies reactivas de oxígeno, los niveles de daño oxidativo (TBARS, carbonilos proteicos, 8-oxo-dG), la actividad de las principales enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GST y GR), así como la concentración de antioxidantes no enzimáticos (GSH) y micronutrientes (Se, Fe, Cu, Zn) en leche de madres lactantes de Baja California Sur.

2. Cuantificar el contenido de xenobióticos (plaguicidas organoclorados, sus metabolitos y elementos traza) en leche de madres lactantes de Baja California Sur.
3. Evaluar el estado de metilación del gen *GSTPI*, que codifica para la expresión de la enzima GST, en muestras de leche y sangre de mujeres de Baja California Sur.
4. Analizar la relación entre las concentraciones de xenobióticos, micronutrientes y los indicadores de estrés oxidativo en leche de madres lactantes sudcalifornianas.
5. Evaluar la influencia de variables antropométricas, alimentación y actividad realizada por las madres lactantes, con la concentración de xenobióticos, micronutrientes e indicadores de estrés oxidativo.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Grupo de estudio

El grupo de estudio incluye 108 mujeres de Baja California Sur, quienes se encontraban entre la primera y segunda semana postparto (7-10 días postparto). Las muestras de leche materna y sangre periférica fueron recolectadas a domicilio por una enfermera voluntaria. Se colectaron 35 mL de leche materna en tubos de plástico con la ayuda de un extractor; posteriormente en refrigeración fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se colectaron 5 mL de sangre periférica en tubos de vidrio con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante.

En el momento de la toma de muestra, tanto de leche como de sangre, se entregó y firmó un documento de consentimiento informado (Anexo A), así como un cuestionario estructurado (Anexo B). Mediante el cuestionario, se recabó información acerca de variables antropométricas (edad, peso corporal, estatura), el número de embarazos y el aporte de diversos tipos de alimento a la dieta de las madres (Anexo B). El peso y la estatura de las madres fueron usados para calcular el índice de masa corporal ( $\text{IMC} = \text{peso (kg)} / \text{estatura al cuadrado (m}^2\text{)}$ ). La información de la alimentación de las madres permitió conocer el consumo de alimentos de origen marino (sin consumo de pescados ni mariscos, consumo de pescados solamente, consumo de mariscos solamente, consumo de pescados y mariscos). El

proyecto y el consentimiento informado fueron aprobados por el Capítulo Baja California Sur de la Academia Nacional Mexicana de Bioética. Para realizar el análisis genético de *GSTP1*, se llevó a cabo la extracción de ADN a partir de muestras de leche (n = 108) y sangre (n = 34).

## **6.2 Procesamiento de muestras**

Las muestras de leche entera fueron homogenizadas y centrifugadas a  $905.6 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  (Sorvall RT, Massachusetts, USA), previo a su análisis. Se agregó fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF, 1 mM) al sobrenadante recuperado con el propósito de inhibir la acción de las proteasas. Para la extracción de ADN de las muestras de leche y de sangre, se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo para purificación de ADN a partir de sangre total. El volumen de muestra utilizado fue de  $100 \mu\text{L}$ . El líquido filtrado, que contenía el ADN colectado, fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

## **6.3 Antioxidantes enzimáticos**

### **6.3.1 Superóxido dismutasa (*E.C. 1.15.1.1*)**

La actividad de la SOD se determinó como la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán (Hermes-Lima y Storey, 1994). El formazán es un producto cromógeno que puede ser detectado por espectrofotometría a 560 nm. Para determinar la actividad de la SOD se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y la consecuente reducción del NBT a formazán (Suzuki, 2000). Se colocó y mezcló solución amortiguadora sodio-carbonato (50 mM), xantina (0.1 mM), NBT (0.025 mM), EDTA (0.1 mM), xantina oxidasa ( $1 \text{ U mL}^{-1}$  en sulfato de amonio 2 M) y las muestras o el blanco (solución para homogenizar, pH 7.5). Los reactivos se mantuvieron a una temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . Se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos en el espectrofotómetro (Beckman Coulter Du 800, Fullerton, CA). Los resultados se expresaron en unidades (U) por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad



de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la máxima reacción del  $O_2^{\cdot-}$  con el NBT.

### **6.3.2 Catalasa (E.C. 1.11.1.6)**

La CAT tiene como sustrato al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); para cuantificar su actividad, se registró mediante espectrofotometría la desaparición del  $H_2O_2$  a 240 nm (Aebi, 1984). Se agregó una solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M),  $H_2O_2$  (20 mM) y la muestra. El cambio en la absorbancia se midió a 240 nm cada 15 segundos durante 2 minutos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis). La actividad enzimática se expresó en unidades de CAT por miligramo de proteína soluble. Se define una unidad de actividad de CAT, como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 mol  $H_2O_2$  por minuto.

### **6.3.3 Glutación peroxidasa (E.C. 1.11.1.9)**

La actividad de GPx se determinó usando  $H_2O_2$  como sustrato de la enzima y se registró el decremento de la concentración de NADPH en un ensayo vinculado con GR que cataliza la oxidación de NADPH a 240 nm (Flohé y Günzler, 1984; Hermes-Lima y Storey, 1998). Se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH7.2), EDTA (50 mM), azida de sodio (20 mM), GR ( $15 U mL^{-1}$ ), NADPH (1.5 mM), GSH (250 mM), y la muestra homogenizada. La registró la absorbancia a 340 nm por 40 segundos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis). Como blanco, se utilizó una mezcla de las soluciones anteriores, con excepción de la muestra, y se leyó en un espectrofotómetro a 340 nm por 40 segundos. Se realizaron los cálculos utilizando el coeficiente de extinción de NADPH ( $6.22 mmol L^{-1}$ ) y se expresaron los resultados en unidades de actividad de GPx por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1  $\mu mol$  NADPH por minuto.

### **6.3.4 Glutación S-transferasa (E.C. 2.5.1.18)**

La actividad de GST se evaluó mediante la aparición del complejo tioeter glutación dinitrobenzoceno a partir de la conjugación de GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) (Habig y Jakoby, 1980). Se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M), GSH (10

mM), EDTA (60 mM), CDNB (10 mM) y la muestra. Se registró el cambio de absorbancia cada 30 segundos durante 6 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro. La actividad enzimática se expresó en unidades de GST por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad de GST es la cantidad de enzima de que produce 1 mol GSH-conjugado por minuto.

### **6.3.5 Glutación reductasa (*E.C. 1.6.4.2*)**

La enzima glutación reductasa (GR) es una enzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del GSSG a GSH, el cual será utilizado por GPx para la posterior reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de los lipoperóxidos (L-OOH) (Halliwell y Gutteridge, 2007). Se determinó la actividad de GR midiendo la disminución en la absorbancia observada durante la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup> por GSSG (Goldberg y Spooner, 1983; Hermes-Lima y Storey, 1998). Se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH 7.2), EDTA (50 mM), NADPH (2 mM) y la muestra se leyó a 340 nm por 40 segundos en un espectrofotómetro. Como blanco se utilizó una mezcla de todas las soluciones anteriores, con excepción de la muestra. Los resultados se expresaron en unidades de GR por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad de GR se define como la cantidad de enzima que reduce 1 μmol GSSG por minuto.

## **6.4 Antioxidantes no enzimáticos**

### **6.4.1 Glutación**

Para cuantificar la concentración de glutación (GSH) se utilizó el método de (Griffith, 1980) con las modificaciones descritas por Hermes-Lima y Storey (1998). Este método se basa en la reacción de GSH con ácido 5, '5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) que da como producto una coloración amarilla que puede detectarse por espectrofotometría a 412 nm. Se homogenizaron las muestras en ácido sulfosalicílico (5%). Posteriormente, las muestras fueron burbujeadas con nitrógeno (N<sub>2</sub>) gaseoso por 10 segundos, se centrifugaron por 5 minutos a  $17004.8 \times g$  a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf® que fueron colocados en hielo. Para determinar la concentración de GSH total (GSH-Eq) se agregó a una celda de plástico la muestra, NADPH (0.3 mM), DTNB (6 mM), GR (50 U mL<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>), se registró la absorbancia a 412 nm durante 130 segundos en un espectrofotómetro. La concentración de GSH-Eq se calculó a partir de una curva estándar utilizando GSH en lugar de muestra. Los resultados se expresan en nanomoles de GSH- Eq por miligramo de proteína.

## **6.5 Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO)**

### **6.5.1 Radical superóxido**

La tasa de producción de radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) se cuantificó mediante técnicas fotocolorimétricas registrando la reducción de ferricitocromo c para producir ferrocitocromo c en un tiempo determinado. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (Jenway 6505 UV/Vis, Princeton, NJ, USA) a 550 nm (Markert *et al.*, 1984). Los datos se expresaron en nmol de superóxido por miligramo de proteína por minuto.

## **6.6 Indicadores de daño oxidativo**

### **6.6.1 Daño oxidativo a lípidos**

Se midió el nivel de peroxidación de lípidos como el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante la cuantificación de la concentración de malondialdehído (MDA) (Persky *et al.*, 2000). El MDA es un pigmento rosa cristalino que se forma cuando los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos, producto de la lipoperoxidación, reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y se registra la absorbancia a 532 nm. Para la cuantificación de TBARS, se preparó una curva estándar con 1, 1, 3,3- tetraetoxipropano (TEP) en un rango de 0 a 5 nmoles  $250 \mu L^{-1}$ . Los tubos con la curva estándar y el homogenizado se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Para detener la reacción, todos los tubos se colocaron en baño de hielo e inmediatamente se les agregó ácido tricloroacético (TCA, 12.5%). Posteriormente, se añadió ácido tiobarbitúrico (TBA, 1%) y se incubó a 90°C con agitación durante 10 minutos. Finalmente, los tubos se enfriaron en baño de hielo y fueron centrifugados a  $905.6 \times g$  por 10 minutos a 4°C. Una vez recuperado el sobrenadante, se leyó la absorbancia a 532 nm. Los niveles de TBARS en las muestras de leche se obtuvieron a partir de la curva estándar. Los resultados se expresaron en nmoles de TBARS por miligramo de proteínas solubles.

### 6.6.2 Daño oxidativo a proteínas

El daño oxidativo a proteínas se cuantificó como el contenido de carbonilos proteicos (Levine *et al.*, 1994; Vázquez-Medina *et al.*, 2006), derivados carbonilos resultantes de las reacciones de interacción entre aldehídos procedentes de la peroxidación de proteínas (Konigsberg Fainstein y Aguilar-Maldonado, 2008). Se midió la formación de un complejo entre los derivados carbonilados de las proteínas y la 2,4-dinitrofenil hidracina (DNPH). Se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de leche entera, homogenizándola con ácido sulfosalicílico (5%). El líquido homogenizado se centrifugó a  $22639.5 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregó DNPH (10 mM) a las muestras y ácido clorhídrico (HCl) (2 M) a los blancos y se dejaron incubar por una hora. Al término de este tiempo, se añadió ácido tricloroacético (TCA, 20%), se centrifugó a  $22639.5 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminaron los sobrenadantes, y se realizaron 3 lavados con etanol-acetato de etilo (1:1) centrifugando después de cada lavado a  $22639.5 \times g$  por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al término de la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con clorato de guanidina (6 M), para desnaturalizar las proteínas. Se incubaron los tubos por 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y nuevamente fueron centrifugados a  $22639.5 \times g$  por 5 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes en celdas de plástico para ser leídas en el espectrofotómetro con barrido en el rango de 340-410 nm, se registró la absorbancia máxima para determinar la concentración de carbonilos proteicos con ayuda del coeficiente de extinción de  $22 \text{ mmol L}^{-1}$ . Los resultados se expresaron en  $\mu\text{moles}$  de carbonilos proteicos por miligramo de proteína total.

### 6.6.3 Daño oxidativo a ADN

Para la extracción de ADN de las muestras de sangre se utilizó DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN; siguiendo el protocolo para purificación de ADN a partir de sangre total o células, como se mencionó anteriormente. En las muestras de ADN obtenidas, se cuantificó el marcador de daño a ADN, 8-oxo-dG, el cual se produce por la oxidación provocada por ERO. Para la detección del 8-oxo-dG se utilizó un kit comercial para pruebas de ELISA (Trevigen, Inc. Helgerman, Gaithersburg).

### **6.7 Determinación de proteínas totales**

Para normalizar los resultados obtenidos, se cuantificó la concentración de proteínas solubles en las muestras de leche utilizando el método descrito por Bradford (1976), adaptado a microplaca. Se usó un kit comercial (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Se leyó la absorbancia a 590 nm (Microlab 300, Vital Scientific, Países Bajos). Los resultados se expresaron en mg proteína mL<sup>-1</sup>.

### **6.8 Plaguicidas organoclorados**

Se cuantificaron 21 plaguicidas diferentes siguiendo la adaptación del método propuesto por Gardner (2003) (Ávila<sup>1</sup> y Gemio, 2011; Díaz, 2004; Gardner *et al.*, 2003). Los plaguicidas organoclorados se extrajeron a partir de las muestras de leche entera (1 g) con solventes grado HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) (Acros, New Jersey, USA). Posteriormente, las muestras fueron purificadas utilizando florisil y sulfato de sodio anhidro (Sigma Chemical, New Jersey, USA). Finalmente, se inyectó 1 µL de muestra en el cromatógrafo de gases (Network GC System, Palo Alto CA, USA) en una columna capilar (30 m x 0.025 mm x 0.25 µm, 5% fenilmetil silicona, HP-5MS Agilent, Wilmington, DE, USA). Se utilizaron 1, 7, 8 triclorodibenzo-p-dioxina (TriCDD) y 1, 2, 3, 4-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TetraCDD) (Accu Standar, New Haven, C.T., USA) como estándares para el cálculo de la eficiencia de recuperación del proceso, la cual fue del 80%. Los resultados se expresaron en mg L<sup>-1</sup>. El rango del límite de detección se encuentra entre 0.0016 y 0.003 mg L<sup>-1</sup>, dependiendo del tipo de plaguicida.

### **6.9 Determinación de elementos traza**

Se cuantificó la concentración de elementos traza, mediante espectrofotometría de absorción atómica (de Figueiredo *et al.*, 2010). Aproximadamente 10 mL (≈ 10 gr) de leche entera, fueron pesados y transferidos a vasos de teflón; donde fueron digeridos con 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 6 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) (Mallinckrodt J.T. Baker, USA) en un horno de

microondas (Mars 5X, CEM; Matthews, USA). El producto de la digestión fue aforado a 50 mL con agua desionizada y posteriormente fue filtrado. Las concentraciones de Hg, As, y Se fueron cuantificadas utilizando espectrofotómetro de absorción atómica (HG 3000, GBC, Australia) (XplorAA, GBC, Braeside Australia). Se utilizó la técnica de vapor frío para la cuantificación de Hg, y la generación de hidruros para la determinación de la concentración de As y Se. Los análisis se realizaron por duplicado, utilizando los estándares SRM1954 para Hg y GBW10017 para As y Se. Los límites de detección (LD) fueron  $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$  para As y Se,  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$  para Hg,  $0.011 \text{mg L}^{-1}$  para Cd,  $0.15 \text{mg L}^{-1}$  para Pb y Fe;  $0.0142 \text{mg L}^{-1}$  para Cu y  $0.016 \text{mg L}^{-1}$  para Zn. Se obtuvo un porcentaje de recuperación  $\geq 90\%$ .

#### **6.10 Detección de metilación del gen *GSTP1***

Para la extracción de ADN de muestras de sangre y leche materna se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN, como se mencionó anteriormente; el ADN colectado fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para la modificación de ADN se utilizó el kit EZ DNA Methylation Gold de Zymo Research. Se preparó un gel de poliacrilamida 29:1 al 6%. Se montó el gel en una cámara de electroforesis (Dual Adjustable Slab Gel DASG-250), se realizó la electroforesis a 190 volts, por 1:30 horas. Para revelar el gel, se utilizó solución fijadora de nitrato de plata durante 5 minutos y solución reveladora. Por último, se lavó el gel con agua corriente.

#### **6.11 Métodos estadísticos**

Se evaluó la normalidad de los datos mediante una prueba de *Kolmogorov-Smirnov* tanto para la distribución de los indicadores de estrés oxidativo, como para los datos de concentración de plaguicidas y elementos traza. Debido a que la mayoría de las variables no presentaron una distribución normal, las estadísticas descriptivas se presentan como mediana, rango, y percentiles 25 y 75 (Zar, 1996). Se realizaron correlaciones de Spearman para evaluar la relación entre indicadores de estrés oxidativo y xenobióticos (Zar, 1996).

Previo a los análisis estadísticos, se agrupó a los plaguicidas de acuerdo con su estructura química como hexachlorociclohexanos (HCHs), en este grupo se incluyó a los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ ; clordanos (isómeros  $\beta$  y  $\delta$ ); ciclodienos (aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, endrín cetona, y endosulfán I y II); diclorodifeniltricloroetanos (DDTs), este grupo incluyó a los metabolitos del DDT, *pp*-DDE y *pp*-DDD; heptacloros (heptacloro y  $\beta$ -heptacloro epóxido); hexaclorobenceno, y metoxicloro (Labrada-Martagón et al., 2011). Con el fin de calcular las estadísticas descriptivas (mediana, percentil 25 y 75%) de las concentraciones de POCs, se utilizó un método distribucional, llamado gráfico de probabilidad, utilizado para extrapolar datos reportados por debajo del límite de detección (LD) (Helsel, 1990; Labrada-Martagón et al., 2011). Sin embargo, para completar la base de datos necesaria para realizar los análisis multivariados, se utilizó la mitad del valor del LD de cada POC (0.0008–0.0015), cuando el valor se encontraba por debajo de éste (Farnham et al., 2002). Se empleó un análisis de componentes principales (ACP) con el objetivo de detectar aquellas variables que contribuyen a explicar la variabilidad de los datos. Adicionalmente el ACP, permite conocer patrones de distribución entre la concentración de xenobióticos y las defensas antioxidantes así como los indicadores del daño oxidativo (Labrada-Martagón et al., 2011; Tabachnick y Fidell, 2001). En los análisis multivariados sólo se consideraron aquellos plaguicidas que fueron reportados en al menos 30% de las muestras analizadas (Helsel, 1990). Se consideraron cargas factoriales significativas cuando el valor fue  $\geq 0.5$ . Las mujeres lactantes fueron agrupadas de acuerdo con el consumo de pescados y mariscos (no consume pescados ni mariscos ( $n = 25$ ); consumo de pescados solamente ( $n = 39$ ); consumo de mariscos solamente ( $n = 2$ ); consumo de pescados y mariscos ( $n = 42$ )). También las madres fueron agrupadas de acuerdo con el número de embarazos, en una gesta ( $n = 43$ ), dos gestas ( $n = 38$ ) y tres o más gestas ( $n = 27$ ).

Se realizó un análisis discriminante (AD) para determinar si las variables (indicadores de estrés oxidativo y concentración de xenobióticos) permiten discriminar o separar los grupos definidos *a priori*. El estadístico Lambda de Wilks y las distancias cuadradas de Mahalanobis se usaron para evaluar la significancia de la separación entre grupos (Tabachnick y Fidell, 2001; Vélez-Alavez et al., 2013). Todos los estadísticos son considerados significativos con

$\alpha \leq 0.05$ . Los análisis se realizaron en Statistica v.8 (Inc, 2007) y R v.3.0.2 (Pinheiro *et al.*, 2013).

En el caso de los datos de elementos traza que cayeron por debajo del LD, se utilizó la mitad del valor de éste para cada elemento con el fin de completar la base de datos (Farnham *et al.*, 2002). Se generó un modelo lineal generalizado (GLM), dada la falta de normalidad de los datos ( $p < 0,05$ ) y debido a que los datos fueron continuos y positivos (Celis de la Rosa y Labrada-Martagon, 2014). Se utilizó un error de distribución *gamma* debido a su flexibilidad, partiendo de una curva con sesgo hacia la derecha hacia una curva de Gauss simétrica (cuando el parámetro de dispersión  $\nu$  es más pequeño que  $\mu^2$ ,) (Smith *et al.*, 2009). Después de evaluar varios modelos, el GLM se llevó a cabo con las variables más significativas, incluyendo la concentración de carbonilos proteicos (variable respuesta) y las variables explicativas, actividad de las enzimas antioxidantes (GPX, GR, SOD, CAT), tasa de producción  $O_2^{\bullet-}$ , y la concentración de GSH, Se, Cd y Pb.

Para transformar la variable respuesta, se utilizó la función enlace *log canónica*, lo que permite una relación lineal entre las variables independientes y variables dependientes (Cayuela, 2010; Lindsey, 1997; Smith *et al.*, 2009). El GLM se realizó a partir de un modelo máximo donde se incluyeron las variables mencionadas anteriormente ( $k = 9$ ) ( $\beta = 30.522$ , error estándar = 6,7386,  $p < 0,01$ , escala 439.947, desviación residual = 47514.298). Con el fin de obtener el modelo adecuado mínimo se empleó un procedimiento hacia atrás (backward); los modelos alternativos fueron evaluados mediante el uso de la devianza como criterio de bondad de ajuste y teniendo en cuenta la contribución de cada variable al modelo, se utilizaron los residuales como método de validación. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS (versión 20), y la significancia estadística considerada fue de  $\alpha = 0.05$ .



## 7. RESULTADOS

Las mujeres que participaron en este estudio presentaron una edad promedio de 27 años, (rango = 15 a 44 años), con un IMC de  $30 \text{ kg m}^{-2}$  (rango = 19 a  $49 \text{ kg m}^{-2}$ ). De las 108 mujeres lactantes muestreadas para este estudio, 95 (88%) reportaron a la ciudad de La Paz como lugar de residencia, y 67 (62%) reportaron como ocupación, ser amas de casa. Debido a esta escasa variabilidad, no se pudieron realizar los análisis de datos por actividad ni por lugar de residencia.

### 7.1 Indicadores de estrés oxidativo

Los resultados de la actividad antioxidante, concentración de antioxidantes endógenos e indicadores de daño oxidativo en leche materna, se presentan en la tabla I. De acuerdo con los resultados obtenidos con la prueba de Kruskal Wallis, solamente se encontraron diferencias significativas en la actividad de GST en relación con el número de embarazos y la alimentación de origen marino (Tabla II). Se encontró que el incremento en el número de embarazos aumentaba la actividad de la enzima GST, el valor más alto de la mediana se reportó en mujeres con 3 o más embarazos ( $0.009 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$ ). Con relación a la alimentación, el grupo con mayor actividad de GST fue aquel que consumía tanto pescados como mariscos ( $0.01 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$ ), seguido del grupo que solamente consumía pescados ( $0.007 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$ ).

**Tabla I.** Indicadores de estrés oxidativo en leche materna de mujeres de Baja California Sur ( $n=108$ ).

	<b>Mediana</b>	<b>Rango</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>
TBARS (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	231.755	3.089 - 2066.284	102.986	474.521
Carbonilos proteicos (μmol mg <sup>-1</sup> proteína)	21.690	0.569 - 99.236	6.428	47.525
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> proteína)	0.009	0.0003 - 0.160	0.004	0.017
GPx (U mg <sup>-1</sup> proteína)	0.063	0.0003 - 10.203	0.016	0.207
SOD (U mg <sup>-1</sup> proteína)	198.172	1.652 - 2117.956	39.977	775.454
GR (U mg <sup>-1</sup> proteína)	0.017	0.0003 - 7.324	0.005	0.051
GST (U mg <sup>-1</sup> proteína)	0.002	0.000 - 0.070	0.0008	0.006
CAT (U mg <sup>-1</sup> proteína)	0.253	0.0000 - 4.578	0.105	0.488
GSH (nmol mg <sup>-1</sup> proteína)	21.948	1.420 - 253.428	12.180	38.348

**Tabla II.** Comparaciones de los indicadores de estrés oxidativo, por grupos (número de embarazos y alimentación) de mujeres de Baja California Sur ( $n = 108$ ).

Indicadores de estrés oxidativo	Embarazos <sup>1</sup>		Alimentación <sup>2</sup>		$p^3$
	Mediana	$p^3$	Mediana	$p^3$	
TBARS	E1	229.85	A1	277.45	0.58
	E2	388.12	A2	381	
	E3	395.66	A3	289.91	
			A4	375.95	
Carbonilos proteicos	E1	35.22	A1	23.4	0.22
	E2	23.2	A2	33.46	
	E3	29.12	A3	7.36	
			A4	33.99	
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	E1	0.015	A1	0.02	0.15
	E2	0.016	A2	0.01	
	E3	0.01	A3	0.03	
			A4	0.01	
GPx	E1	0.19	A1	0.52	0.4
	E2	0.42	A2	0.38	
	E3	0.53	A3	0.05	
			A4	0.18	
SOD	E1	328.81	A1	381.34	0.86
	E2	471.2	A2	468.38	
	E3	466.29	A3	490.75	
			A4	412.9	
GR	E1	0.2	A1	0.19	0.99
	E2	0.26	A2	0.23	
	E3	0.05	A3	0.03	
			A4	0.07	

GST	E1	0.004		A1	0.006	
	E2	0.008	<b>0.02</b>	A2	0.007	<b>0.008</b>
	E3	0.009		A3	0.003	
				A4	0.01	
CAT	E1	0.32		A1	0.44	
	E2	0.4		A2	0.49	
	E3	0.57	0.88	A3	0.98	0.61
				A4	0.28	
GSH	E1	30.3		A1	29.79	
	E2	29.1	0.67	A2	32.44	
	E3	26.65		A3	13.32	0.34
				A4	22.1	

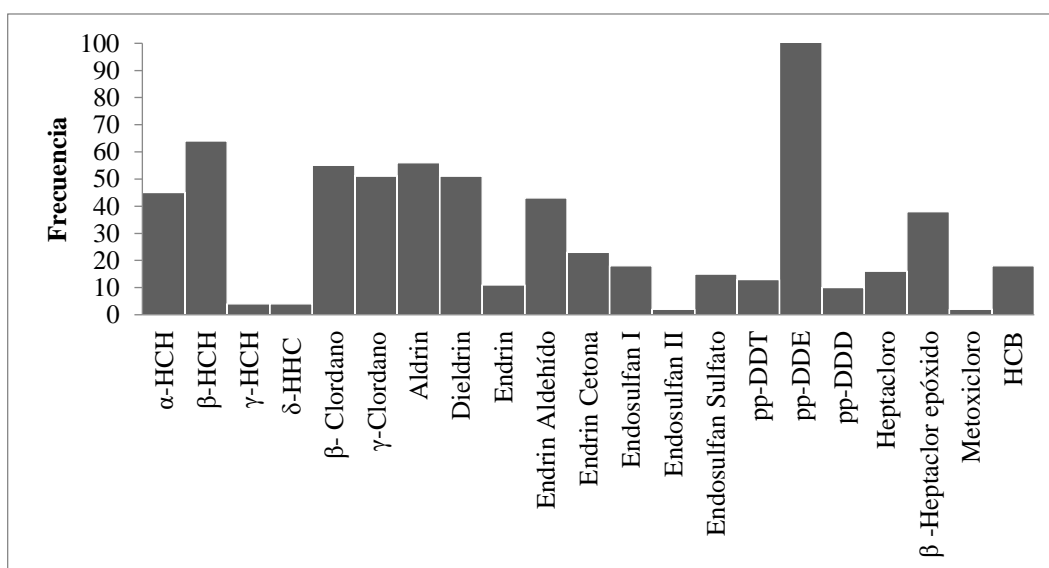
Notas: <sup>1</sup> grupos de acuerdo al número de gestas, (E1 = Una gesta ( $n = 36$ ), E2 = dos gestas ( $n = 36$ ), E3 = tres o más gestas ( $n = 36$ ); <sup>2</sup> grupos de acuerdo al consumo de pescados y mariscos (A= 1 =no hay consumo de pescados ni mariscos ( $n =25$ ); A2 = consumo de pescados solamente ( $n = 39$ ); A3 =consumo de mariscos solamente ( $n =2$ ); A4 =consumo pescados y mariscos ( $n = 42$ ); <sup>3</sup> prueba de Kruskal Wallis, las diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.5$ ) se presentan en negritas.

## 7.2 Plaguicidas organoclorados

Se detectaron 21 POCs en la leche de las 108 mujeres. De acuerdo a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, los resultados obtenidos no presentaron una distribución normal (Tabla III), las estadísticas descriptivas se presentan en la tabla IV. Los POCs detectados con mayor frecuencia fueron diclorodifenil dicloroetileno (DDE) en 108 mujeres (100%),  $\beta$ -hexaclorociclohexano ( $\beta$ -HCH) en 64 mujeres (60.2%), aldrín en 56 mujeres (53.8%),  $\alpha$ - y  $\gamma$ -clordano en 55 y 51 mujeres (51 y 47.2%), respectivamente (Fig. 2). Se encontraron correlaciones significativas entre POCs e indicadores de estrés oxidativo (Tabla V), se presentan sólo los valores de las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ). Las principales correlaciones encontradas fueron entre la actividad de GR y la concentración de aldrín (coeficiente de correlación de Spearman,  $r = -0.5$ ), y entre la actividad de SOD y la concentración de  $\alpha$ -HCH ( $r = 0.45$ ). El análisis de componentes principales (ACP) generó tres componentes principales (CPs), los cuales explican el 38.5% del total de la varianza de los datos (16.3%, 12.4% y 9.8%, respectivamente) (Fig. 3). Las cargas factoriales correspondientes a las correlaciones entre los CPs obtenidos y las variables originales se muestran en la tabla VI. El primer CP se correlacionó positivamente con la actividad de SOD, también con la concentración de hexaclorociclohexanos y ciclodienos (aldrín, endrín aldehído). El segundo CP se correlacionó negativamente con el contenido de clordanos y dieldrín. El tercer CP se correlacionó negativamente con la actividad de GPx y con la concentración de  $\gamma$ -clordano y heptacloro. Se graficaron el CP1 y CP2 (Fig. 3). Los datos agrupados en el extremo positivo, correspondiente al eje del CP1, presentaron mayor actividad de SOD y mayor concentración de hexaclorociclohexanos y ciclodienos. En este mismo gráfico, las muestras con mayor concentración de clordanos y dieldrín se congregaron en el lado negativo del eje correspondiente al CP2. En el gráfico de CP1 y CP3, las muestras con mayor actividad de GPx y mayor contenido de  $\gamma$ -clordano y heptacloro se agruparon en el lado negativo del eje de CP3.

**Tabla III.** Prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov de la concentración de plaguicidas organoclorados e indicadores de estrés oxidativo, cuantificados en leche materna de mujeres de Baja California Sur (n= 108).

Variables	D	p	Variables	D	p
TBARS	0.174	< 0.01	Endosulfán I	0.433	< 0.01
Carbonilos proteicos	0.145	< 0.05	Endosulfán II	0.535	< 0.01
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.221	< 0.01	Endosulfán Sulfato	0.508	< 0.01
GPx	0.375	< 0.01	Aldrín	0.319	< 0.01
SOD	0.228	< 0.01	Dieldrín	0.351	< 0.01
GR	0.417	< 0.01	Endrín	0.471	< 0.01
GST	0.309	< 0.01	Endrín Aldehído	0.356	< 0.01
CAT	0.23	< 0.01	Endrín Cetona	0.454	< 0.01
GSH	0.172	< 0.01	p,p-DDE	0.313	< 0.01
α-HCH	0.448	< 0.01	p,p-DDD	0.52	< 0.01
β-HCH	0.225	< 0.01	p,p-DDT	0.474	< 0.01
γ-HCH	0.54	< 0.01	Heptacloro	0.468	< 0.01
δ-HCH	0.54	< 0.01	β-Heptacloro epóxido	0.329	< 0.01
β-Clordano	0.324	< 0.01	Hexaclorobenceno	0.445	< 0.01
γ-Clordano	0.339	< 0.01	Metoxicloro	0.53	< 0.01



**Figura 2.** Frecuencia de plaguicidas organoclorados detectados en muestras de leche materna de 108 mujeres lactantes de Baja California Sur.

**Tabla IV.** Concentración de plaguicidas organoclorados (mg L<sup>-1</sup>) en leche materna de mujeres de Baja California Sur (n = 108).

Plaguicida	Mediana	Rango	Percentil 25%	Percentil 75%	Frecuencia (%)
$\alpha$ -HCH <sup>1</sup>	0.011	0.003 - 0.391	0.011	0.012	41.67
$\beta$ -HCH <sup>2</sup>	0.002	0.0015 - 0.030	0.002	0.005	60.19
$\delta$ -HCH <sup>2</sup>	0.007	0.007- 0.021	0.007	0.007	3.70
$\gamma$ -HCH <sup>1</sup>	0.005	0.005 - 0.013	0.005	0.005	3.70
$\beta$ -clordano <sup>1</sup>	0.003	0.002 - 0.008	0.002	0.004	50.93
$\gamma$ -clordano <sup>1</sup>	0.004	0.001 - 0.010	0.003	0.005	47.22
<i>p,p</i> -DDD <sup>1</sup>	0.003	0.002 - 0.017	0.003	0.003	9.26
<i>p,p</i> -DDE <sup>1</sup>	0.088	0.015 - 1.634	0.079	0.112	100.00
<i>p,p</i> -DDT <sup>1</sup>	0.006	0.006 - 0.083	0.006	0.006	12.04
Aldrín <sup>1</sup>	0.009	0.004 - 0.993	0.004	0.010	52.78
Dieldrín <sup>1</sup>	0.002	0.002 - 0.005	0.002	0.003	47.22
Endrín <sup>1</sup>	0.001	0.001 - 0.013	0.001	0.001	10.19
Endrín aldehído <sup>2</sup>	0.046	0.003 - 0.615	0.018	0.023	38.89
Endrín cetona <sup>2</sup>	0.011	0.011 - 0.062	0.011	0.011	21.30
Endosulfán I <sup>2</sup>	0.005	0.004 - 0.221	0.005	0.005	15.74
Endosulfán II <sup>1</sup>	0.006	0.006 - 0.015	0.006	0.006	1.85
Endosulfán sulfato <sup>1</sup>	0.005	0.005 - 0.020	0.005	0.005	13.89
Heptacloro <sup>2</sup>	0.003	0.002 - 0.018	0.003	0.003	14.81
$\beta$ -Heptacloro epóxido <sup>1</sup>	0.002	0.001 - 0.020	0.002	0.002	35.19
Metoxicloro <sup>2</sup>	0.007	0.007 - 0.031	0.007	0.007	1.85
HCB <sup>1</sup>	0.001	0.001 - 0.015	0.001	0.001	16.67

Notas: <sup>1</sup> límite de detección 0.0016; <sup>2</sup> límite de detección 0.003 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabla V.** Coeficientes de correlación de Spearman entre el índice de masa corporal, indicadores de estrés oxidativo, y concentraciones de plaguicidas organoclorados cuantificados en leche materna de mujeres de Baja California Sur ( $n= 108$ ,  $p < 0.05$ )

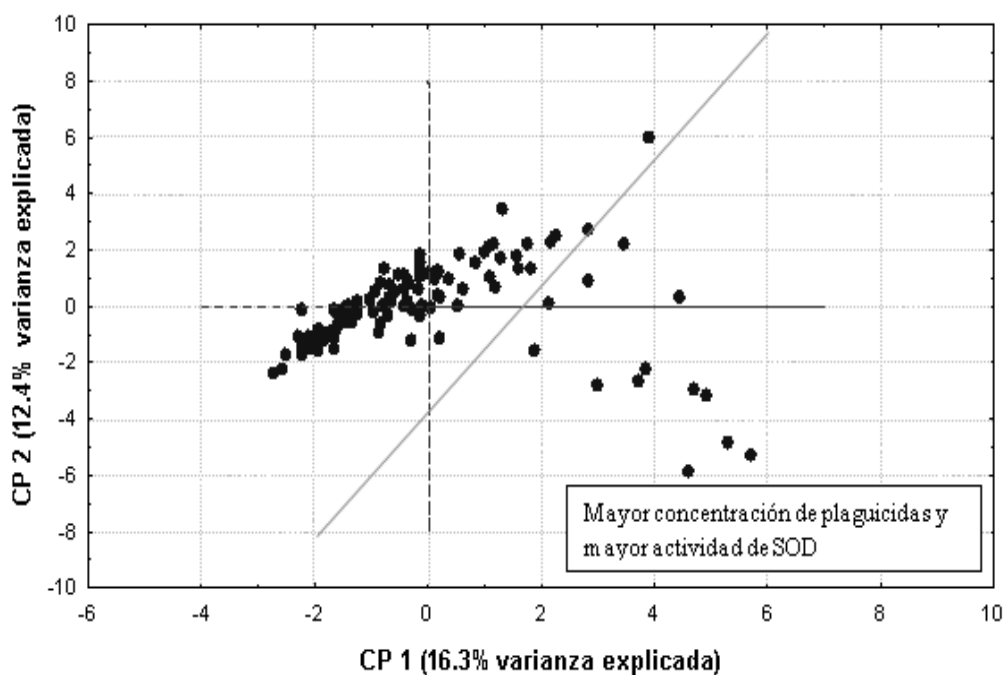
Variables	$\alpha$ -HCH	$\beta$ -HCH	$\delta$ -HCH	$\Sigma$ HCH	$\gamma$ -Clordano	$\Sigma$ Clordanos	Endrín	Aldrín	Dieldrín	$\Sigma$ Ciclodienos	DDE	DDD	DDT	$\Sigma$ DDT	$\Sigma$ Heptacloros
IMC	0.20			0.23											
TBARS				0.20	-0.18	0.08	-0.23					0.26			
PC			0.19					0.26							
GPx	0.35	0.20			-0.32	-0.36	0.26	-0.29	-0.23		-0.21				
SOD	0.45	0.23			-0.30	-0.36	0.28	-0.29		0.39		0.32	0.24		0.25
GR	0.39	0.21			-0.32	-0.37		-0.50			-0.28	0.28	0.19		
CAT	0.19														
GSH	0.25										-0.26			-0.21	



**Tabla VI.** Cargas factoriales del análisis de componentes principales de las concentraciones de plaguicidas organoclorados e indicadores de estrés oxidativo cuantificados en leche materna de mujeres de Baja California Sur ( $n = 108$ ).

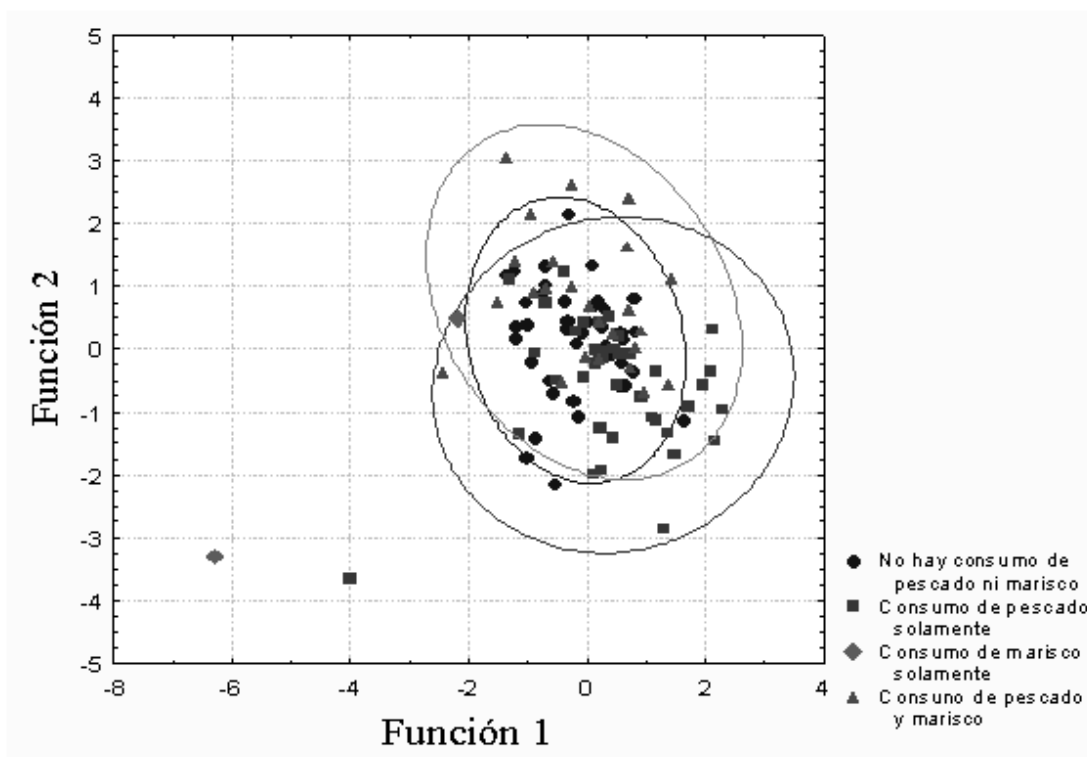
	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>	<b>Factor 3</b>
Varianza explicada (%)	16.3	12.4	9.8
TBARS	0.255	0.195	-0.006
Proteínas carboniladas	-0.277	-0.309	0.170
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	-0.071	0.111	-0.248
GPX	0.365	0.401	<b>-0.508</b>
SOD	<b>0.701</b>	0.149	-0.176
GR	0.109	0.134	0.201
GST	0.000	0.247	-0.095
CAT	0.144	0.313	-0.144
GSH	0.295	-0.126	-0.284
α-HCH	<b>0.647</b>	-0.580	0.066
β-HCH	0.187	0.124	-0.099
ΣHCHs	<b>0.653</b>	-0.571	0.064
β-Clordano	-0.401	-0.410	-0.181
γ-Clordano	-0.359	-0.459	<b>-0.540</b>
ΣClordanos	-0.490	<b>-0.585</b>	-0.519
Aldrín	<b>-0.542</b>	-0.023	-0.260
Dieldrín	-0.254	<b>-0.509</b>	-0.295
Endrín Aldehído	<b>0.516</b>	-0.320	-0.095
ΣCiclodienos	<b>0.752</b>	-0.564	-0.052
DDE	0.158	-0.065	0.281
ΣDDTs	0.204	-0.101	0.275
β-Heptacloro epóxido	0.267	0.437	<b>-0.609</b>
ΣHeptacloros	0.359	0.195	<b>-0.646</b>

Nota: las cargas factoriales significativas ( $p < 0.05$ ) se presentan en negritas.

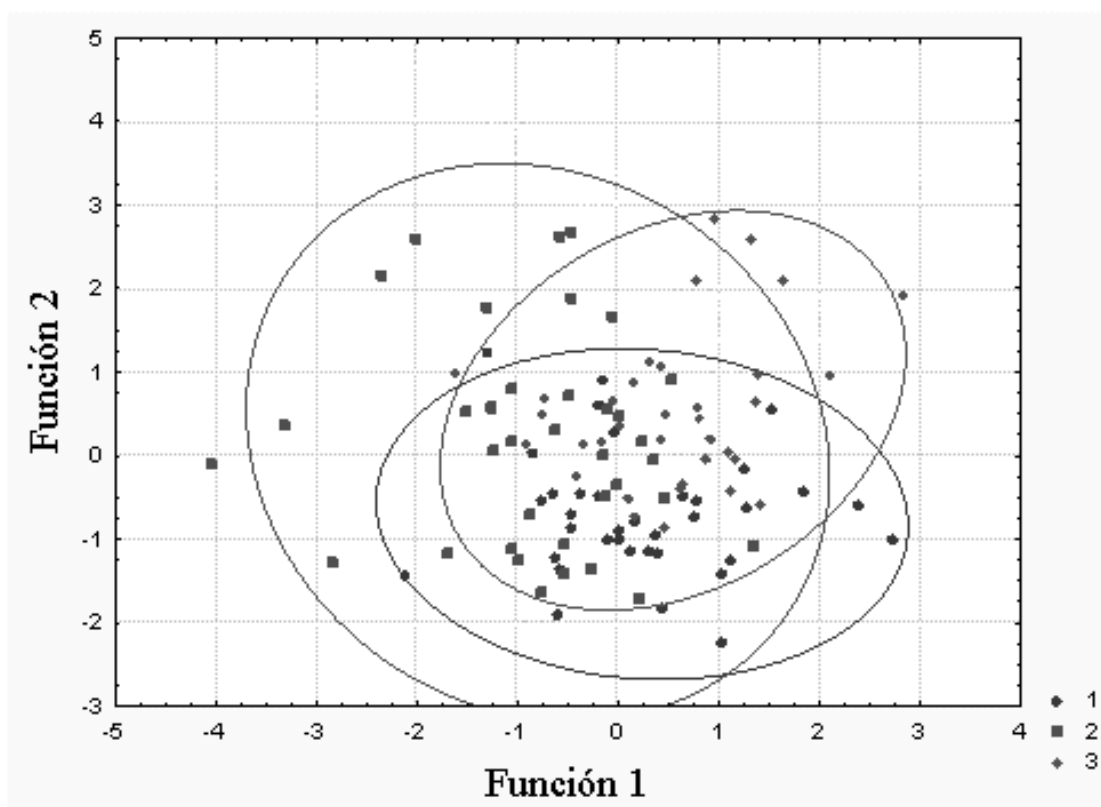


**Figura 3.** Puntaje muestral (sample scores) del análisis de componentes principales de la concentración de plaguicidas e indicadores de estrés oxidativo en mujeres lactantes de Baja California Sur. La línea del gráfico no tiene significado estadístico.

Los resultados del análisis discriminante (AD) mostraron dos funciones discriminantes para las mujeres agrupadas de acuerdo con su consumo de alimentos de origen marino (sin consumo de pescados ni mariscos; consumo de pescados solamente; consumo de mariscos solamente; consumo de pescados y mariscos) (Fig. 4). Sin embargo, el análisis no mostró una separación significativa entre grupos con las variables predictoras (POCs e indicadores de estrés oxidativo) ( $\text{Lambda de Wilks} = 0.44$ ,  $F_{(69,245)} = 1.14$ ,  $p = 0.23$ ). En el análisis discriminante basado en grupos por número de embarazos, se obtuvieron dos funciones discriminantes canónicas ( $\text{Lambda de Wilks} = 0.58$ ,  $F_{(46,166)} = 1.11$ ,  $p < 0.31$ ) (Fig. 5). Por lo tanto, se asume que los indicadores de estrés oxidativo y las concentraciones de POCs cuantificados en este estudio no son suficientes para explicar las diferencias entre grupos.



**Figura 4.** Puntajes canónicos (canonical scores) para las funciones discriminantes canónicas de la concentración de plaguicidas e indicadores de estrés oxidativo de mujeres lactantes de Baja California Sur agrupadas de acuerdo al consumo de alimentos de origen marino (no hay consumo de pescados ni mariscos ( $n = 25$ , círculos); consumo de pescados solamente ( $n = 39$ , cuadrados); consumo de mariscos solamente ( $n = 2$ , rombos); consumo de pescados y mariscos ( $n = 42$ , triángulos)).



**Figura 5.** Puntajes canónicos (canonical scores) para las funciones discriminantes canónicas, de la concentración de plaguicidas e indicadores de estrés oxidativo de mujeres lactantes de Baja California Sur agrupadas de acuerdo al número de gestas. Una gesta ( $n = 36$ ), dos gestas ( $n = 36$ ), tres o más gestas ( $n = 36$ ).

### 7.3 Elementos traza

Se presentan los resultados de las concentraciones de elementos traza Se, As, Hg, Zn, Fe, Cu, Cd y Pb, en la tabla VII. Los elementos esenciales Se, Fe, Cu y Zn fueron detectados en el 100% de las muestras. Se agruparon los datos de acuerdo con el número de embarazos (uno, dos y tres o más); así como de acuerdo con el consumo de pescados y mariscos (sin consumo de pescados ni mariscos; consumo de pescados solamente; consumo de mariscos solamente; consumo de pescados y mariscos) para analizar posibles diferencias entre grupos.

**Tabla VII.** Concentraciones de elementos traza cuantificadas en leche materna de mujeres de Baja California Sur ( $n = 108$ ).

<b>Elemento traza</b>	<b>Mediana</b>	<b>Rango</b>	<b>Percentil 25%</b>	<b>Percentil 75%</b>	<b>Frecuencia (%)</b>
Se ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	19.79	49.81	15.32	27.84	100.00
As ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.72	13.12	0.72	0.72	24.07
Hg ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1.54	24.84	0.54	3.58	85.19
Zn ( $\text{mg L}^{-1}$ )	3.66	10.06	2.83	4.97	100.00
Cu ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.59	0.98	0.49	0.66	100.00
Fe ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.46	1.18	0.37	0.53	100.00
Pb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	2.61	195.12	0.08	0.08	55.55
Cd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.01	3.51	0.01	0.01	21.30

**Tabla VIII.** Coeficientes de correlación de Spearman entre los indicadores de estrés oxidativo y las concentraciones de elementos traza cuantificados en leche materna ( $n = 108$ ,  $p < 0.05$ ).

	<b>Se</b>	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Cd</b>	<b>Pb</b>
TBARS				0.2		-0.22
PC	0.28		0.2			-0.27
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>						
GPx	-0.24				0.22	
SOD	-0.2					
Se						-0.24
Zn			0.64			
Cu		0.54				
Fe					-0.28	
Cd				-0.28		0.25
Pb	-0.24				0.25	

Notas: Se presentan sólo los resultados estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ).

De acuerdo con los resultados en la matriz de correlación de Spearman, se presentaron correlaciones entre las concentraciones de los elementos traza y los indicadores de estrés oxidativo. La concentración de Se correlacionó significativa y positivamente con los niveles de proteínas carboniladas como indicadores de daño oxidativo a proteínas ( $r = 0.33$ ) y negativamente con la actividad de SOD ( $r = -0.21$ ). Las concentraciones de Zn y Cu mostraron una correlación positiva ( $r = 0.54$ ) entre ellas; la concentración de Cu también presentó relación positiva con la concentración de proteínas carboniladas ( $r = 0.2$ ). Los niveles de Fe y Cd tuvieron una correlación negativa de  $r = -0.27$  entre sí; además, la concentración de Fe presentó un coeficiente de correlación de  $r = 0.2$  con los niveles de TBARS, y la concentración de Cd presentó relación positiva con la actividad de GPx y con los niveles de Pb ( $r = 0.22$  y  $r = 0.24$ , respectivamente). Por último, la concentración de Pb correlacionó negativamente con los niveles de TBARS ( $r = -0.22$ ), de proteínas carboniladas ( $r = -0.27$ ) y de Se ( $r = -0.24$ ), y correlacionó positivamente con la concentración de Cd ( $r = 0.25$ ) (Tabla VIII).

**Tabla IX.** Cargas factoriales del análisis de componentes principales de las concentraciones de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo.

	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>	<b>Factor 3</b>
Varianza explicada (%)	13.2	10	9.4
TBARS	0.22	0.04	<b>-0.53</b>
Proteínas carboniladas	<b>-0.64</b>	0.18	-0.37
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	0.30	-0.30	0.29
GPX	<b>0.66</b>	-0.09	-0.31
SOD	<b>0.62</b>	0.03	-0.47
GR	0.22	0.01	0.20
GST	0.06	0.05	-0.29
CAT	0.44	-0.15	-0.10
GSH	0.28	-0.16	0.28
Se	-0.45	0.34	-0.21
As	0.07	0.24	-0.31
Hg	0.20	-0.13	-0.12
Zn	-0.26	<b>-0.70</b>	-0.32
Cu	-0.29	<b>-0.78</b>	-0.34
Fe	-0.24	-0.33	0.08
Cd	0.27	0.22	-0.15
Pb	0.15	-0.27	0.40

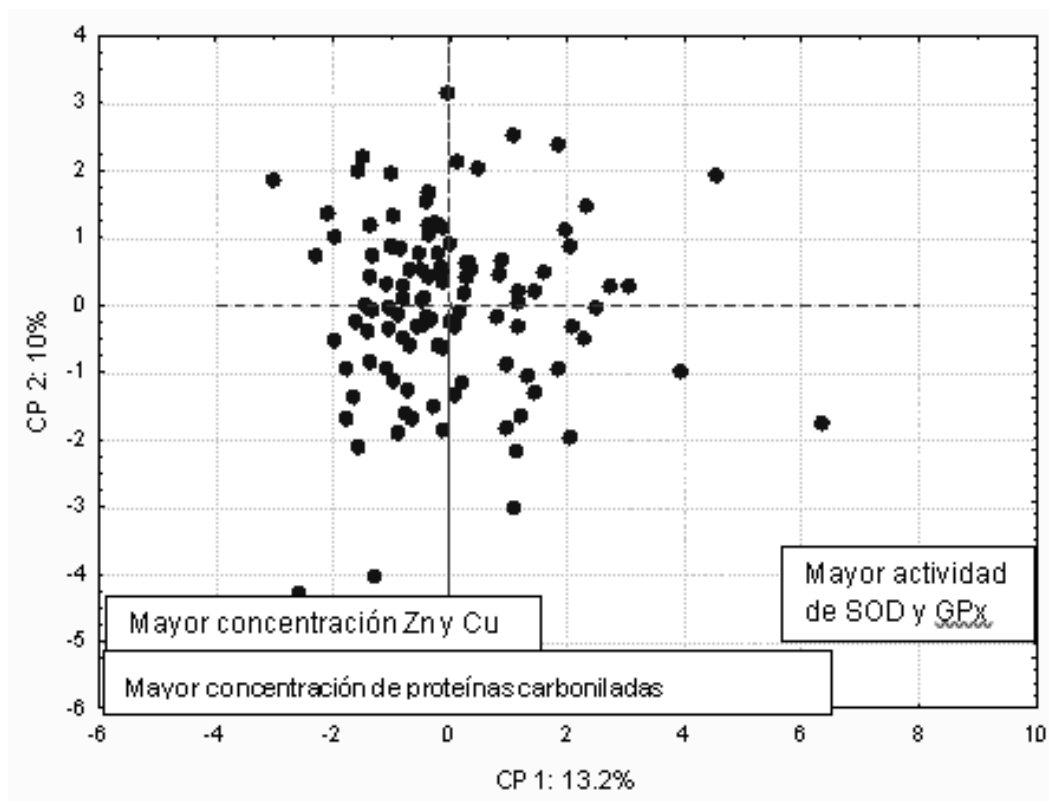
Nota: las cargas factoriales significativas ( $p < 0.5$ ) se presentan en negritas.

El ACP generó tres componentes principales, los cuales explican el 32.6% del total de la varianza de los datos (13.2%, 10% y 9.4%, respectivamente) (Tabla IX). El CP1 fue correlacionado positivamente con la actividad de SOD y de GPx, y negativamente con el contenido de carbonilos proteicos. En el CP2 las variables más representativas fueron las concentraciones de Zn y Cu. Finalmente, para el CP3 la variable más explicativa fue el contenido de TBARS (Tabla IX).

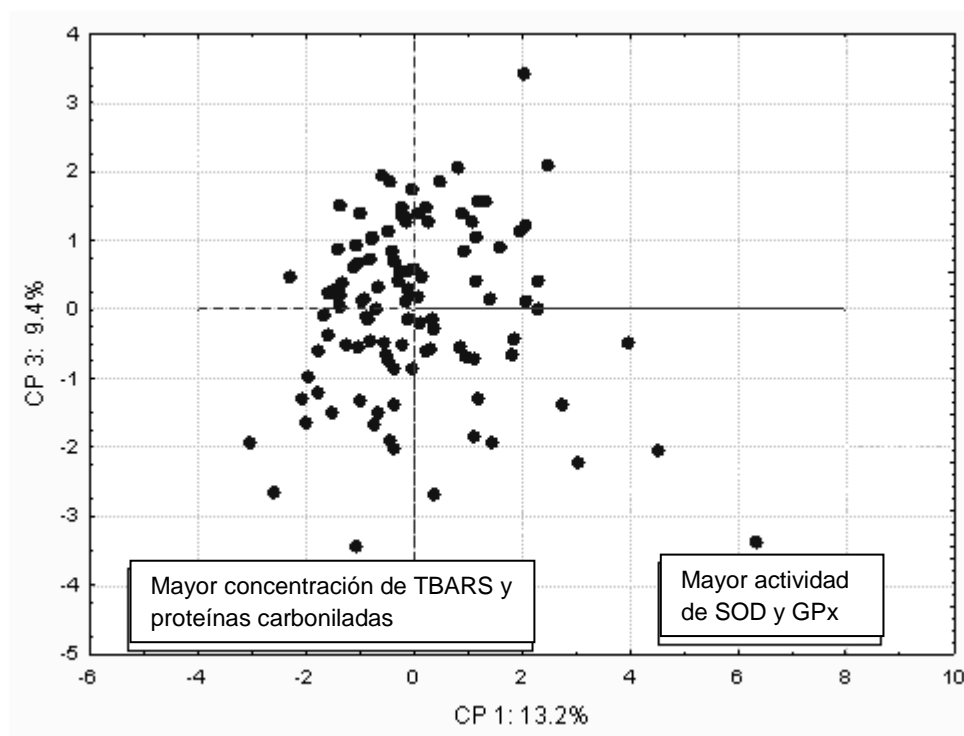
Los datos agrupados en el extremo positivo correspondiente al eje del CP1, presentaron mayor actividad de SOD y de GPx, en el extremo negativo se presentan las mujeres con mayor concentración de proteínas carboniladas; ello sugiere una relación inversa entre la actividad de las enzimas antioxidantes y el daño oxidativo a proteínas. En el eje correspondiente a CP2, se congregaron en el extremo negativo las muestras con mayor concentración de Zn y Cu, cofactores de SOD (Fig. 6).

En el gráfico de CP1 y CP3, las muestras con mayor actividad de SOD y de GPx se presentan en el extremo positivo del CP1; mientras que las muestras con mayor contenido de TBARS se encuentran en el extremo negativo del eje correspondiente al CP3 (Fig. 7).



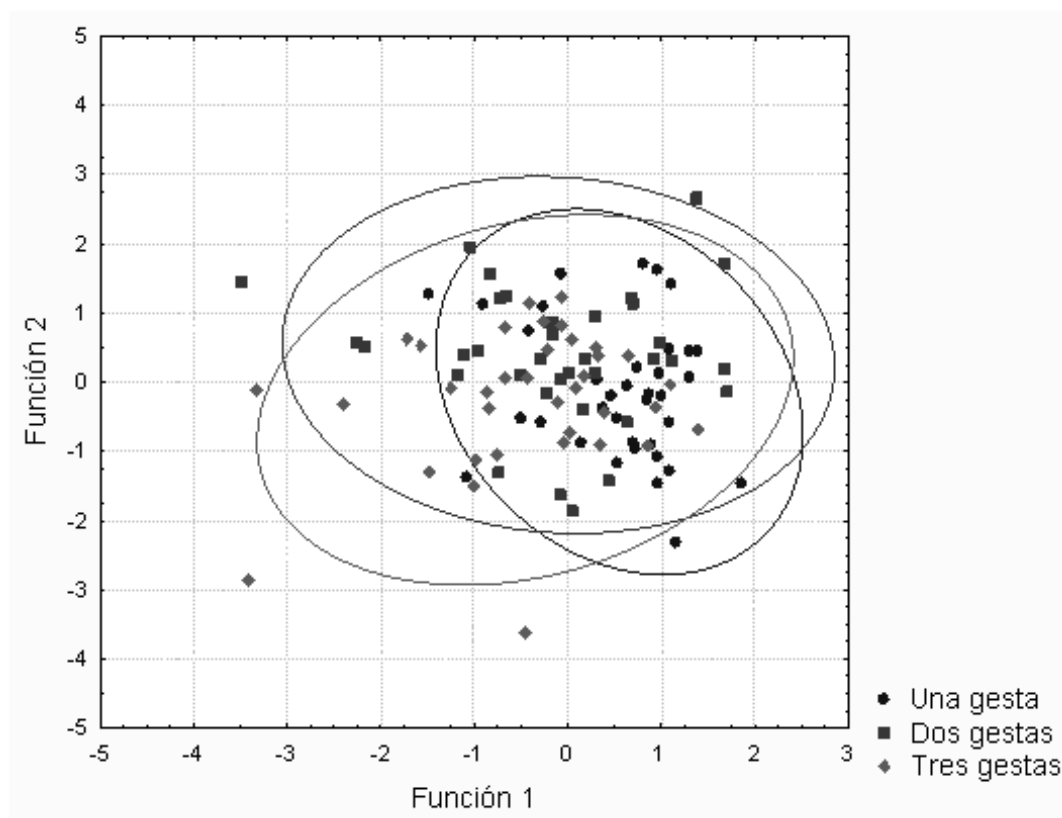


**Figura 6.** Puntaje muestral (sample scores) del análisis de componentes principales, de la concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en mujeres lactantes de Baja California Sur.

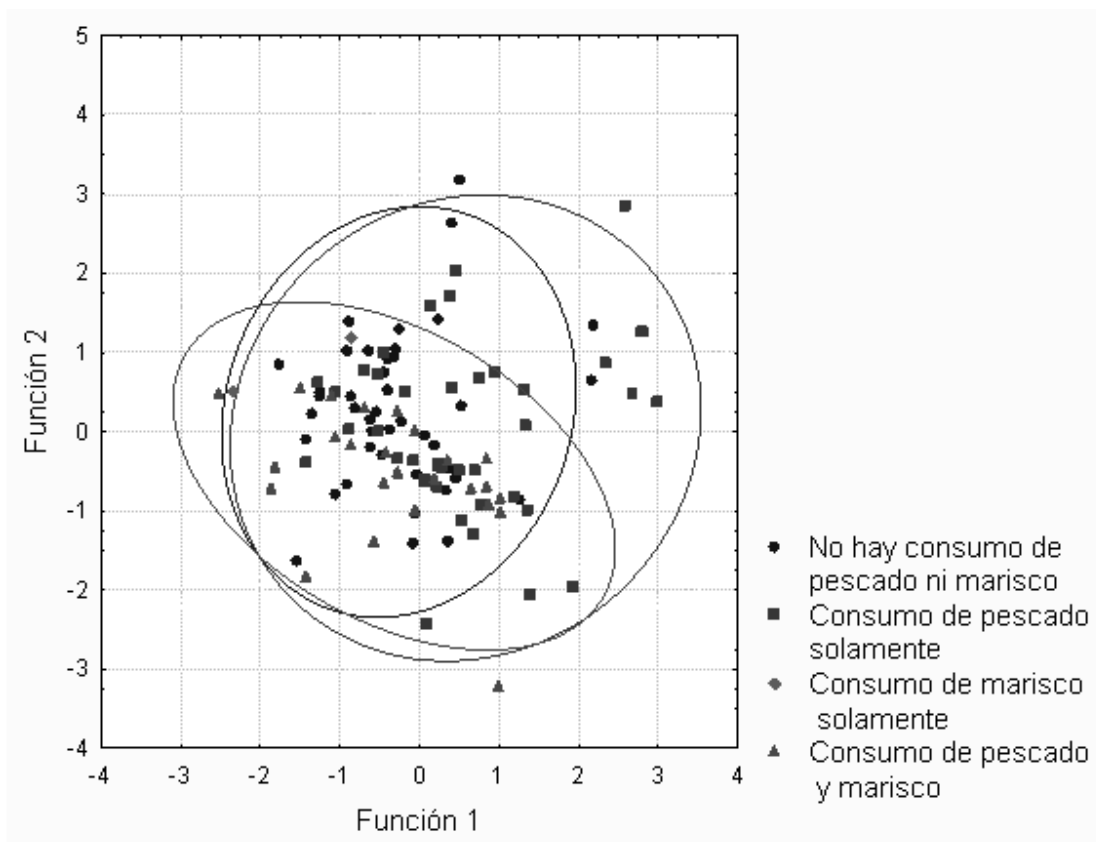


**Figura 7.** Puntaje muestral (sample scores) del análisis de componentes principales, de la concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo en mujeres lactantes de Baja California Sur.

Los resultados del análisis discriminante (AD) mostraron dos funciones discriminantes canónicas, de acuerdo con los grupos establecidos por número de embarazos. Sin embargo, con base en los estadísticos ( $\text{Lambda de Wilks} = 0.78$ ,  $F_{(26,186)} = 0.93$ ,  $p < 0.56$ ) los datos no muestran separaciones entre grupos (Fig. 8). En el caso de las mujeres agrupadas de acuerdo con su consumo de alimentos (Fig. 9), el análisis no mostró una separación significativa entre grupos ( $\text{Lambda de Wilks} = 0.70$ ,  $F_{(36,272)} = 0.98$ ,  $p = 0.50$ ). Se sugiere que el contenido de elementos traza en conjunto con los indicadores de estrés oxidativo no explican las diferencias entre las agrupaciones definidas.



**Figura 8.** Puntajes canónicos (canonical scores) para las funciones discriminantes canónicas de la concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo de mujeres lactantes en Baja California Sur agrupadas de acuerdo al número de embarazos. Una gesta ( $n = 36$ ), dos gestas ( $n = 36$ ), tres o más gestas ( $n = 36$ ).



**Figura 9.** Puntajes canónicos (canonical scores) para las funciones discriminantes canónicas de la concentración de elementos traza e indicadores de estrés oxidativo de mujeres lactantes agrupadas de acuerdo al consumo de pescados y mariscos (no hay consumo de pescados ni mariscos (n = 25); consumo de pescados solamente (n = 39); consumo de mariscos solamente (n = 2); consumo pescados y mariscos (n = 42)).

### 7.3.1 Modelo lineal generalizado (GLM) para la concentración de carbonilos proteicos

Se realizó un modelo lineal generalizado partiendo de un modelo máximo ( $k = 9$ ). El modelo adecuado mínimo obtenido incluye la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR, así como la concentración de GSH y de los elementos traza Se, Pb y Cd ( $\beta=19.570$ , error est. = 5.2839,  $p<0.01$ , escala 446.731, devianza residual = 51486.957) (Tabla X). La ecuación del modelo mínimo ajustado (Eq. 4) predice un valor de la mediana de la concentración de carbonilos proteicos de 29.849  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  en comparación con la mediana observada (21.689  $\mu\text{mol mg}^{-1}$ ).

$$CP = e^{19.570 - 3.995(GPx) - 4.715(GR) - 0.136(GSH) + 0.759(Se) + 0.179(Pb) - 10.913(Cd)} \quad (4)$$

**Tabla X.** Coeficientes del modelo mínimo ajustado en el análisis del modelo lineal generalizado con distribución de error gamma para la concentración de carbonilos proteicos ( $\mu\text{mol mg}^{-1}$  proteína) en leche materna de mujeres de Baja California Sur ( $n = 108$ ).

Variable Respuesta	Parámetros	$\beta$	Error Est. <sup>1</sup>	Intervalo de confianza de Wald 95%		Prueba de Hipótesis		
				Inferior	Superior	Wald Chi-cuadrada	gl <sup>2</sup>	p
CP <sup>3</sup>	(Intercepto)	19.57	5.28	9.21	29.93	13.72	1	<0.01
	GPX	-3.99	1.59	-7.11	-0.88	6.32	1	0.01
	GR	-4.72	1.81	-8.27	-1.16	6.78	1	<0.01
	GSH	-0.13	0.06	-0.24	-0.03	6.09	1	0.01
	Se	0.76	0.22	0.32	1.19	11.58	1	<0.01
	Pb	0.18	0.04	0.09	0.26	16.58	1	<0.01
	Cd	-10.91	2.84	-16.48	-5.34	14.76	1	<0.01
	Escala	476.73	64.87	365.12	622.45			

Notas: <sup>1</sup> Error estándar; <sup>2</sup> grados de libertad; <sup>3</sup> concentración de carbonilos proteicos.

## 7.4 Daño oxidativo a ADN

A partir de las 34 muestras de sangre colectadas, se midió el daño oxidativo al ADN cuantificando los niveles de 8-oxo-dG. Los resultados se muestran en la tabla XI.

**Tabla XI.** Niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina como indicador de daño oxidativo al ADN en sangre de mujeres de Baja California Sur ( $n = 34$ ).

	Mediana	Rango	Percentil 25%	Percentil 75%
8-oxo-dG (ng mL <sup>-1</sup> )	1.27	0.18 – 27.22	0.66	2.52

Se llevaron a cabo correlaciones de Spearman para evaluar la relación entre el daño a ADN (8-oxo-dG) y las concentraciones de las diferentes sustancias xenobióticas (POCs y elementos traza) cuantificadas en el presente estudio; los resultados se presentan en la tabla XII. No se encontraron relaciones significativas entre POCs y 8-oxo-dG; sin embargo, se observó una correlación significativa entre la concentración de Hg en leche materna y el daño oxidativo medido en muestras de sangre ( $r = -0.36$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla XII).

Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis para buscar diferencias entre grupos, de acuerdo con su alimentación (frecuencia de consumo de pescado, mariscos, cerdo, pollo, res, arroz, frijol y lácteos), ocupación, número de amalgamas, y hábitos de fumar de las mujeres. No se observaron diferencias significativas en el indicador de daño oxidativo al ADN entre grupos ( $p > 0.05$ ) (Tabla XIII).

**Tabla XII.** Coeficientes de correlación de Spearman entre 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina y las concentraciones de xenobióticos medidas en sangre y leche de mujeres de Baja California Sur ( $n = 34$ ,  $p < 0.05$ ).

	<b>8-oxo-dG</b>	<b>r<sup>1</sup></b>
<b>Plaguicidas organoclorados</b>	$\alpha$ -HCH	0.07
	$\beta$ -HCH	0.19
	$\beta$ - clordano	0.30
	$\gamma$ - clordano	-0.07
	Aldrín	0.12
	Dieldrín	0.06
	Endrín aldehído	-0.06
	DDE	-0.05
	$\beta$ - heptacloro	0.06
<b>Elementos traza</b>	Zn	0.05
	Cu	0.32
	Fe	0.22
	Se	0.28
	As	0.06
	Hg	<b>-0.36</b>
	Pb	-0.06

Notas: <sup>1</sup> las correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) se presentan en negritas.

**Tabla XIII.** Valores de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina de acuerdo con la alimentación, ocupación, número de amalgamas y hábito de fumar de mujeres Baja California Sur (n= 34).

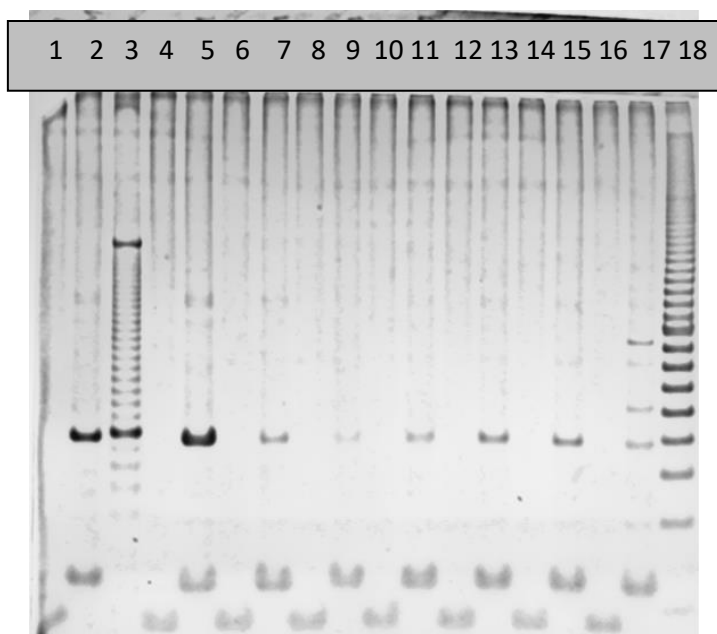
Alimentos (frecuencia de consumo)		Diferencias entre medias %						
		Mediana <sup>1</sup>	p 25%	p 75%	G1 vs G2	G1 vs G3	G2 vs G3	p <sup>2</sup>
Pescado	mensual	1.39	0.59	3.25				
	quincenal	0.84	0.52	2.7				
	semanal	1.31	0.86	2.35	-39.44	-5.09	56.71	0.9
Mariscos	mensual	1.31	0.67	2.47				
	quincenal	0.88	0.84	1.72				
	semanal	1.72	0.7	4.18	-33.23	30.66	95.69	0.91
Cerdo	mensual	1.39	0.76	3.88				
	quincenal	1.14	0.49	2.04				
	semanal	0.82	0.71	1.36	-17.57	-40.91	-28.32	0.47
Pollo	mensual	3.83	3.83	3.83				
	quincenal	0.96	0.57	1.35				
	semanal	1.22	0.67	2.47	-74.92	-68.14	27.06	0.37
Res	mensual	--	--	--				
	quincenal	2.26	1.35	8.89				
	semanal	1.18	0.66	2.36	--	--	-47.85	0.49
Arroz	mensual	4.8	4.8	4.8				
	quincenal	13.7	6.94	20.46				
	semanal	1.22	0.67	2.35	185.34	-74.61	-91.1	0.44
Frijol	mensual	3.83	3.83	3.83				
	quincenal	0.56	0.56	0.56				
	semanal	1.27	0.68	2.42	-85.23	-66.88	124.29	0.37
Lácteos	mensual	1.31	1.31	1.31				
	quincenal	0.56	0.56	0.56				
	semanal	1.3	0.68	2.62	-57.04	-0.03	130	0.63
Ocupación	Empleada-Comerciante	0.74	0.51	1.65				
	Hogar	1.22	0.76	3.83				
	Estudiante-Profesionista	2.34	1.52	3.68	64.44	215.12	91.64	0.09
Amalgamas	Ninguna	1.16	0.82	4.07				
	Una o dos	1.44	0.99	1.89				
	Tres o más	1.52	0.59	2.52	24.29	30.83	5.26	0.19
Fumar	No fuman	1.14	0.56	2.37				
	Fuman	1.74	0.99	2.79	52.39	--	--	0.78

Nota: <sup>1</sup> 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (ng mL<sup>-1</sup>); <sup>2</sup> Prueba de Kruskal-Wallis.

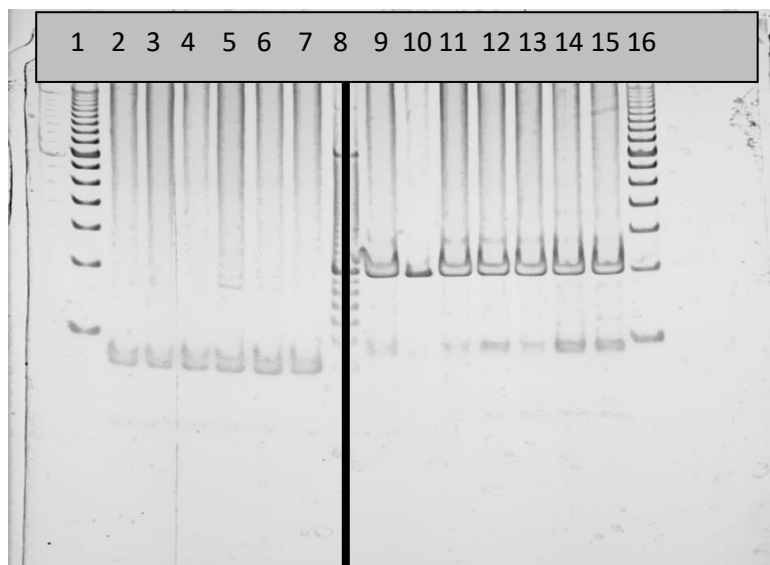


### 7.5 Evaluación de la metilación de *GSTP1*

Se determinó la metilación del gen *GSTP1*, que codifica para la expresión de la enzima GST, en 108 muestras de leche materna de mujeres de Baja California Sur. Posteriormente, se analizaron 34 muestras de sangre del mismo grupo de mujeres para evaluar el estado de metilación del gen *GSTP1*. De acuerdo con los resultados, ninguna de las 108 muestras de leche materna presentó metilación de la región promotora del gen *GSTP1* (Fig. 10).



**Figura 10.** Electroforesis en gel de poliacrilamida del gen *GSTP1*, para evaluación de metilación en muestras de leche materna de mujeres de Baja California Sur. En la columna 3 se observa el marcador utilizado (10 pb); las columnas 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 representan 6 muestras de ADN utilizando primers para *GSTP1* metilada y las columnas 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 representan 8 muestras de ADN utilizando primers para *GSTP1* no metilada.



**Figura 11.** Electroforesis en gel de poliacrilamida del gen *GSTP1*, para evaluación de metilación en muestras de sangre de mujeres de Baja California Sur. En la primera y última columna se observa el marcador utilizado (10 pb); las columnas de la región izquierda representan 6 muestras de ADN utilizando primers para *GSTP1* metilada y las columnas de la región derecha representan 6 muestras de ADN utilizando primers para *GSTP1* no metilada.

Resultados similares se observaron en las muestras de sangre; es decir, sólo amplificaron las muestras de ADN que contenían primers para genes no metilados de *GSTP1* (Fig. 11). Por lo tanto, el ADN de las muestras de sangre analizadas no presenta genes *GSTP1* metilados.

Durante el proceso de modificación del ADN, se utilizó el kit EZ DNA Methylation Gold de Zymo Research, el cual contiene bisulfito de sodio que permite que las citosinas no metiladas sean sustituidas por uracilos, lo que no sucede con las 5-metilcitosinas de los dinucleótidos CpG; los primers utilizados contienen timinas en lugares específicos para unirse con los uracilos y por lo tanto se amplifican sólo las secuencias que no se encuentran metiladas (Mesa-Cornejo *et al.*, 2006).

## 8. DISCUSIÓN

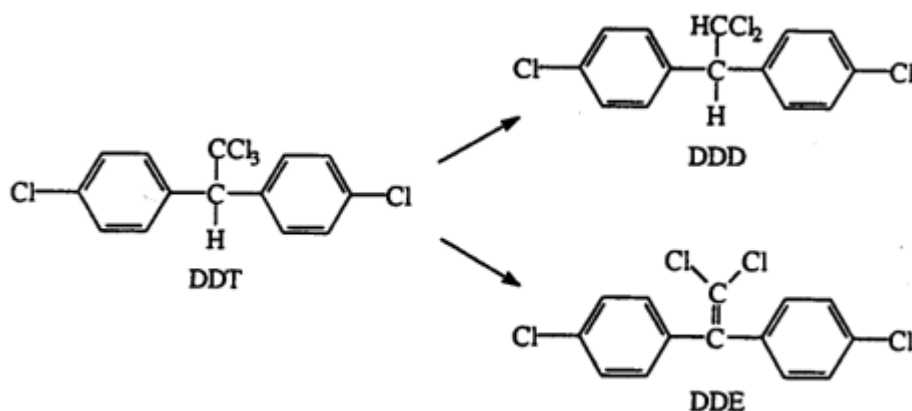
### 8.1 Defensas antioxidantes y plaguicidas organoclorados

La lactancia se considera una forma de detoxificación del cuerpo humano. La presencia de POCs puede provocar cambios metabólicos e incrementar el riesgo de padecer distintas enfermedades (Azeredo *et al.*, 2008; Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2010). En el año 2001, el gobierno de México formó parte de la Convención de Estocolmo, firmando un documento donde se prohibió el uso y producción de contaminantes orgánicos persistentes (POPs); los POCs se encuentran entre este tipo de contaminantes (Ramírez *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en leche materna sobre la concentración de estos contaminantes permiten conocer el grado de contaminación de las madres, así como del área local. Esto se debe a que es fácil obtener una muestra de leche y a que no es un método invasivo (Der Parsehian, 2008). Adicionalmente, la leche materna es una matriz adecuada para la cuantificación de xenobióticos por su contenido de lípidos, ya que una gran cantidad de contaminantes son lipofílicos. Estudios anteriores han reportado que la lactancia es la principal ruta de eliminación de POCs del cuerpo de la madre (Chávez-Almazán *et al.*, 2014).

El DDT es un plaguicida organoclorado sintético utilizado principalmente en agricultura y en el control de enfermedades transmitidas por vectores. Su entrada al organismo es por vía dérmica e ingestión gastrointestinal, posteriormente viaja a través del torrente sanguíneo unido a lípidos sanguíneos por sus propiedades lipofílicas (Galván-Portillo *et al.*, 2002). Los principales sitios de almacenamiento de DDT y sus metabolitos, DDE y DDD, son hígado, riñón, sistema nervioso y tejido adiposo. Su exposición crónica se ha relacionado con toxicidad hepática y renal, carcinogénesis, alteración de la respuesta inmune, así como problemas en el sistema reproductivo y endocrino (Naz, 2004). El DDT es similar en estructura química al DDE y DDD, éstos últimos no tienen valor comercial, pero el DDD se usó en el pasado como plaguicida (Friis, 2012). El DDE es el principal metabolito del DDT encontrado en el tejido adiposo, también se ha detectado en muestras de sangre, leche materna, sangre del cordón umbilical y placenta (Sullivan y Krieger, 2001). Se estima que el

DDT tarda entre 10 y 20 años para ser eliminado del tejido humano, aunque la vida media de su metabolito DDE puede ser aún mayor (Sullivan y Krieger, 2001). La acumulación de DDE en áreas con alto contenido lipídico, así como la movilización de los lípidos durante la lactancia, explican el aumento de la concentración de este plaguicida en el cuerpo de los niños después del nacimiento (Naz, 2004). Otros trabajos encontraron mayores concentraciones de DDT que de DDE en niños, lo cual se ha interpretado como una menor capacidad por parte de los niños para metabolizar DDT (Kaloyanova y El Batawi, 1991).

De acuerdo con los resultados del presente trabajo (Fig. 2), el único plaguicida detectado en el 100% de las muestras fue DDE, este plaguicida se sintetiza en el organismo una vez que el DDT es ingerido (Kaloyanova y El Batawi, 1991). El metabolismo del DDT incluye la descloración y la deshidrocloración (Naz, 2004). Se ha propuesto que el DDD se forma por descloración de DDT; por otra parte, la deshidrocloración del DDT genera a su metabolito DDE (Fig. 14) (Naz, 2004).



**Figura 12.** Metabolismo de dicloro difenil tricloroetano. A partir de DDT y por una reacción de descloración se genera diclorodifenildicloroetano, en el caso de que la reacción sea una deshidrocloración se produce el metabolito p,p-dicloro difenil dicloroetileno (Naz, 2004).

Los valores obtenidos para DDT, DDD y DDE fueron 0.0058, 0.0026 y 0.0875 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, los cuales son comparables con lo reportado previamente. En investigaciones con mujeres de Polonia se reportó que los valores de DDT, DDD y DDE

fueron 0.005, 0.0009 y 0.0211 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Czaja *et al.*, 1997). En mujeres hindúes se reportaron valores de DDT, DDD y DDE de 0.078, 0.210 y 0.672 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Nair *et al.*, 1996). Valores altos de la tasa DDE/DDT son característicos de un ambiente con una alta prevalencia de DDE, causada por su constante acumulación; por el contrario, si la tasa DDE/DDT es baja, indica una exposición reciente a DDT (Chao *et al.*, 2006). La proporción de DDE/DDT obtenida en este estudio fue de 15.1, lo que indica que la exposición a DDT no es reciente. Esto es comparable con estudios anteriores en México, en los cuales se reporta un valor de 6.14 en el año 1999, en el estado de Veracruz, cuando posiblemente se tenía una exposición más reciente a este plaguicida en esa región (Waliszewski *et al.*, 1999). En países desarrollados, como Reino Unido y Nueva Zelanda, se reportan valores de DDE/DDT de 24.2 y 24.1, respectivamente, mientras que en países en desarrollo, tales como Tailandia e Indonesia, se reportan valores de 3.16 y 4.75, respectivamente (Chao *et al.*, 2006). Es probable que la concentración de DDE reportada refleje el uso de DDT, así como su transformación a DDE en el ambiente (Jaga y Dharmani, 2003).

Estudios en madres lactantes reportan que la edad materna tiene una relación (ANOVA,  $p < 0.002$ ) con la acumulación de POCs en leche (Zhou *et al.*, 2012). Estudios anteriores han reportado una relación significativa entre la edad de las personas y la concentración de plaguicidas, específicamente de HCHs y DDTs ( $r = 0.36$  y  $r = 0.34$ , respectivamente) en tejido adiposo, por su alta liposolubilidad y acumulación en tejido adiposo (Aulakh *et al.*, 2007). Por otra parte, también existen reportes donde no se ha encontrado relación alguna entre la edad y la concentración de POCs en leche materna, las diferencias en la concentración de plaguicidas fueron atribuidas a la alimentación de origen marino, especialmente de pescado contaminado (Azeredo *et al.*, 2008). En el presente trabajo, no se encontró una correlación significativa entre la edad de las madres y la concentración de POCs en leche materna. Las diferencias con respecto a trabajos anteriores podrían sugerir que la concentración de POCs en tejido adiposo es el reflejo del tiempo de exposición y bioacumulación, mientras que la concentración de POCs en leche materna procede, tanto del tejido adiposo como de la alimentación durante el periodo de lactancia.

En trabajos previos, se ha reportado mayor concentración de DDE y de clordanos totales (528 ng g<sup>-1</sup> lípido y 45 ng g<sup>-1</sup> lípido respectivamente) en individuos con un IMC > 25.6 kg m<sup>-2</sup> (Hardell *et al.*, 2010). En el presente estudio, se encontró una correlación entre el IMC y la suma de HCH ( $r = 0.23$ ,  $p > 0.05$ ); dichos resultados están de acuerdo con lo reportado por Lu *et al.* (2015), quienes encontraron una correlación entre el IMC y los niveles de  $\beta$ -HCH ( $r = 0.171$ ,  $p = 0.044$ ) y  $\Sigma$ HCH ( $r = 0.171$ ,  $p = 0.044$ ) en muestras de leche materna (Lu *et al.*, 2015). La relación entre el IMC y los niveles de HCH se puede explicar por su alta liposolubilidad y su consecuente persistencia en los tejidos con alto contenido lipídico (Li, 1999).

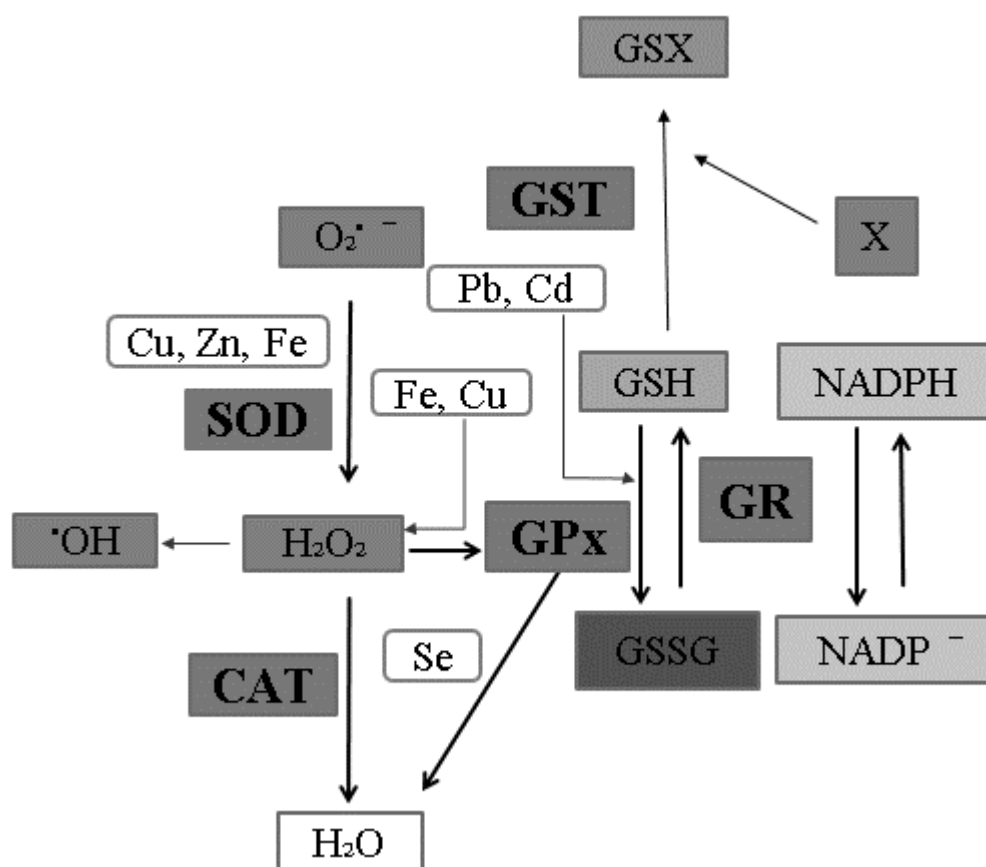
Estudios anteriores han reportado un incremento en la producción de ERO, atribuido a la presencia de plaguicidas, debido a que metabolismo de detoxificación involucra al sistema P450, donde se generan ERO (Ahmed *et al.*, 2000; Androutsopoulos *et al.*, 2013). En el presente estudio, se evaluó la relación entre POCs y la tasa de producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>; sin embargo, no se encontró una correlación entre ellos. Probablemente, la concentración de POCs no fue lo suficientemente elevada para inducir un aumento en la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Alternativamente, es posible que el efecto de los POCs sea mediado por un aumento en la producción de otras ERO que no se cuantificaron en el presente estudio, o que el sistema detoxificante/ antioxidante está actuando para disminuir la concentración y el daño causado por las ERO (Fig.12).

Se ha reportado una relación positiva entre la concentración de los plaguicidas  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y HCHs totales y el contenido de malondialdehído (MDA) en placenta humana, así como una relación negativa entre las concentraciones de POCs y el contenido de GSH (Agarwal *et al.*, 2012). Esto se debe a que los POCs afectan el metabolismo (transporte de glucosa, glucólisis, actividad mitocondrial y oxidación de ácidos grasos) y están asociados con un incremento en la peroxidación, debido al aumento en la producción ERO por inducción del citocromo P450 (Ahmed *et al.*, 2000; Androutsopoulos *et al.*, 2013). En el presente estudio se observó una baja correlación entre los niveles de TBARS, de carbonilos proteicos y la concentración de POCs ( $r < 0.26$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla V). Esta baja correlación

puede ser el resultado de la acción de los antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos), los cuales neutralizan el daño oxidativo generado por ERO. La prevención y neutralización del daño oxidativo se puede llevar a cabo mediante la transformación de algunos radicales libres en moléculas menos reactivas por acción de antioxidantes como SOD, o a través de la reducción de peróxidos, producto de la oxidación de moléculas orgánicas mediante reacciones catalizadas por antioxidantes como GPx y CAT (Fig. 13) (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Los plaguicidas comúnmente inducen una condición de estrés oxidativo por diversas rutas; mediante la presencia de productos del metabolismo detoxificante, por disfunción mitocondrial, o a través del daño a las defensas antioxidantes. Las primeras dos rutas generalmente son características de una exposición aguda o reciente. Mientras que, en una exposición prolongada, los plaguicidas generalmente afectan al sistema antioxidante (Rani y Yadav, 2014). Se han sugerido relaciones significativas entre la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx, GST y GR) y el contenido de POCs (particularmente  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH) en tumores de mujeres con cáncer de mama (Iskan *et al.*, 2002). En el presente estudio, se encontraron correlaciones significativas entre la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de los POCs analizados en muestras de leche materna (Tabla V). La actividad de SOD se correlacionó principalmente con la concentración de  $\alpha$ -HCH, y ciclodienos ( $r = 0.45$  y  $r = 0.39$ ). La actividad de GPx se correlacionó con los niveles de  $\alpha$ -HCH y clordanos ( $r = 0.35$  y  $r = -0.36$ ). La actividad de GR se correlacionó con el contenido de aldrín ( $r = -0.50$ ). Con base en los valores de correlación de Spearman (Tabla V) y los resultados del ACP (Tabla VI), posiblemente las principales enzimas antioxidantes que neutralizan la producción de ERO producidas por POCs son SOD y GPx, mientras que GSH podría estar bloqueando el efecto de endrín aldehído, DDE y la suma de DDTs. Inicialmente, los POCs o los productos de las reacciones de detoxificación (oxido-reducción o conjugación) pueden actuar modificando la actividad de SOD, la cual dismuta el  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$ ; posteriormente,  $H_2O_2$  es convertido a  $H_2O$  por acción de la GPx (Halliwell y Gutteridge, 2007). La actividad de GPx depende de la concentración de GSH, que actúa como donador de protones; GSH es oxidado a GSSG en el proceso (Halliwell y Gutteridge, 2007).

GSH también es requerido para la reacción de detoxificación de GST (Fig. 13) (Halliwell y Gutteridge, 2007); aunque en el presente estudio no se encontró una correlación significativa entre la actividad de GST y la concentración de los POCs evaluados (Tabla V). Para mantener la concentración de GSH, la GR actúa reduciendo GSSG a GSH, lo que permite el reciclaje y reutilización de este antioxidante de bajo peso molecular (Farooqui y Farooqui, 2011; Rani y Yadav, 2014). En consecuencia, tanto las defensas antioxidantes enzimáticas como las no enzimáticas contribuyen a mantener la estabilidad oxido-reducción de las moléculas nutricionales de la leche materna.



**Figura 13.** Sistema antioxidante presente en leche materna (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Se ha reportado que la principal ruta de exposición de POCs es a través de la dieta, especialmente mediante la ingesta de productos de origen animal con alto contenido de grasa (Nag y Raikwar, 2011). La dieta marina se ha relacionado con la presencia de altas



concentraciones de POCs en diferentes poblaciones (Fujii *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2007). Azeredo *et al.* (2008) relacionó la presencia de POCs en leche materna con el tipo de alimentación de mujeres de Brasil, misma que se caracteriza por un alto consumo de pescado, como principal fuente de proteínas. Previamente se ha reportado presencia de POCs en peces capturados en las costas de Brazil (Azeredo *et al.*, 2008). En estudios previos en el suroeste del Golfo de California, se reportó la presencia de 13 POCs diferentes (aldrín, dieldrín y  $\delta$ -HCH (100%), endosulfán 1, endrín, heptacloro epóxido y metoxicloro (80%)) en peces de la zona (Reyes-Montiel *et al.*, 2013). Los peces pueden estar siendo expuestos a materiales de desecho y residuos de tierras agrícolas que se vierten en mares y ríos; esto conlleva a la bioacumulación y almacenamiento de POCs en organismos marinos. Posteriormente, estos plaguicidas son transferidos al ser humano durante el consumo de alimentos marinos (Pazou *et al.*, 2013). Sin embargo, los alimentos de origen marino tienen un alto contenido de antioxidantes, entre ellos se encuentran las vitaminas A, C y E, así como ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 y los carotenoides (Corredor y Landines, 2009; Pham-Huy *et al.*, 2008; Sowmya y Sachindra, 2012) que pueden contrarrestar el efecto de esos xenobióticos (Hamre, 2011; Lien, 2009). Por lo tanto, es relevante evaluar la influencia que el consumo de pescados y mariscos ejerce sobre el nivel de contaminantes y sobre el sistema antioxidante presente en la leche materna. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el consumo de pescados y marisco no es un factor determinante en el nivel de contaminación de la leche. El consumo de alimentos de origen marino tiene beneficios adicionales, como el contenido de proteínas, vitaminas y minerales que funcionan como cofactores de enzimas antioxidantes (Hamre, 2011; Prospéro-García *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 1993).

## 8.2 Sistema antioxidante en relación con la presencia de elementos traza

### 8.2.1 Arsénico

La principal fuente de exposición al As son los alimentos, como pescados, crustáceos, moluscos (90 %), hongos, aves y, en menor medida, carnes, leche y vegetales (Jomova *et al.*, 2011; Sternowsky *et al.*, 2002). Estudios realizados en la zona andina de Colombia presentaron una concentración promedio de As de  $3.2 \mu\text{g L}^{-1}$  en leche de materna (Alonso *et al.*, 2014). Los resultados de esa investigación muestran que las concentraciones de As (suelos  $148 \text{ mg kg}^{-1}$ , sedimentos  $1400 \text{ mg kg}^{-1}$ , vegetales  $5.40 \text{ mg kg}^{-1}$ , agua potable  $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) en esa región exceden los límites especificados por las normas nacionales e internacionales en suelo, sedimentos, agua y/o en la cadena alimentaria, sobre todo en regiones mineras y agrícolas (Alonso *et al.*, 2014). Además, en la misma investigación, no se encontró una asociación entre el número de embarazos y la concentración de As ( $p = 0.53$ ) (Alonso *et al.*, 2014; Concha *et al.*, 1998). Los estudios sobre As en leche materna generalmente reportan valores promedio  $\leq 1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Los límites permisibles de As se encuentran entre  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  en la leche materna y agua potable (Atsdr, 2007; DOF, 2000; R. Gaxiola-Robles *et al.*, 2014). Por lo general, en la mayoría de los estudios que se han reportado, las madres lactantes presentan valores de As, por debajo de los límites establecidos (Alonso *et al.*, 2014; Chao *et al.*, 2014; Gürbay *et al.*, 2012).

Estudios recientes en leche materna de mujeres de Taiwán reportaron una concentración de As de  $0.68 \mu\text{g L}^{-1}$ ; mostrando además una disminución en esta concentración a través de las tres etapas de lactancia calostro, transicional y madura (calostro:  $1.50 \pm 1.50 \text{ ng mL}^{-1}$ , transicional:  $0.68 \pm 1.09 \text{ ng mL}^{-1}$ , leche madura:  $0.27 \pm 1.26 \text{ ng mL}^{-1}$ ) ( $p < 0.01$ ), presumiblemente debido al decremento en el contenido de proteínas unidas a metales (Chao *et al.*, 2014). El contenido de proteínas es mayor en los primeros días de lactancia (Morera Pons *et al.*, 2000). Algunas proteínas tienen una alta capacidad de unión a elementos traza que son necesarios para los niños, aunque también pueden ser transportadoras de elementos tóxicos como el As; posteriormente, moléculas como la lactosa y ácidos grasos pueden facilitar la absorción de As (Chao *et al.*, 2014). Los resultados del presente estudio muestran

valores de As ( $0.67 \mu\text{g L}^{-1}$ ) similares a los reportados por Chao et al. (2014) ( $0.68 \mu\text{g L}^{-1}$ ), y se encuentran dentro de los límites permisibles ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ) para leche materna y agua (Atsdr, 2007; DOF, 2000). Tomando en cuenta que la dieta es la principal vía de exposición a As, es probable que la concentración de este elemento se deba al consumo de pescados y mariscos. Sin embargo, los resultados del presente estudio (Fig. 9) sugieren que la frecuencia de consumo de alimentos de origen marino no es un factor determinante en el contenido de As presente en leche materna en la población de Baja California Sur. Parte de la toxicidad de As se debe al incremento en la producción de ERO, principalmente  $\text{O}_2^{\cdot-}$  y  $\cdot\text{OH}$ , las cuales pueden producirse en reacciones como la reacción de Fenton. Estas especies reactivas aumentan el daño oxidativo especialmente a lípidos; sin embargo, antioxidantes como GSH, SOD, CAT y GPx, ejercen un papel protector contra estas ERO (Jomova *et al.*, 2011).

### 8.2.2 Mercurio

Las principales fuentes de exposición a Hg en el medio ambiente son los combustibles fósiles, la industria del Fe, la metalurgia, el procesamiento de petróleo y cemento, tratamiento de aguas residuales, entre otros (Behrooz *et al.*, 2012). El consumo de pescado durante el embarazo es determinante para la concentración de Hg en el tejido adiposo de las madres. Este elemento es transferido a la leche materna durante la lactancia (Chien *et al.*, 2006). Estudios en España (García-Esquinas *et al.*, 2011) reportaron valores promedio de concentración de Hg de  $0.53 \mu\text{g L}^{-1}$ ; además, se reportan valores menores en mujeres mayores de 30 años que alimentaron a sus hijos exclusivamente con leche materna  $0.46 \mu\text{g L}^{-1}$ ; por otro lado, también se reportaron valores más altos de Hg ( $0.62 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en leche de mujeres con alto consumo de pescados y mariscos ( $134 \text{ g día}^{-1}$ ) aunque esto no fue estadísticamente significativo (García-Esquinas *et al.*, 2011).

Estudios publicados en Irán, reportaron un promedio de  $0.4 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg en leche materna (Behrooz *et al.*, 2012). Por otra parte, estudios realizados en Austria reportan una concentración de  $1.59 \mu\text{g L}^{-1}$  en leche, además de una relación positiva entre la concentración

de Hg y el consumo de trigo; se asume que el consumo de este cereal es el inicio de la cadena de alimentación de productos de granja contaminados con Hg (Gundacker *et al.*, 2002). La concentración promedio de Hg detectada en Taiwán por Chien *et al.* (2006) fue de  $2.03 \mu\text{g L}^{-1}$ ; dicho estudio comparó muestras de leche de mujeres de la ciudad con aquella de mujeres procedentes de una zona pesquera, sin encontrar diferencias en las concentraciones de Hg entre grupos. En el mismo estudio se reportó que la concentración de Hg fue menor en mujeres que incluyeron Se proveniente de alimentos marinos, a pesar de que se esperaba un resultado contrario, la explicación que da el autor incluye la redistribución del Hg, formación de un complejo mercurio-selenio, competencia por sitios de unión, y prevención del daño oxidativo; lo antes mencionado y el estilo de vida de las madres influye en la concentración de Hg en leche materna (Chien *et al.*, 2006).

En el presente estudio, se encontró una concentración de Hg de  $1.54 \mu\text{g L}^{-1}$  de leche materna; los límites permisibles de Hg en alimentos se encuentran en el rango de  $0.001 \text{ mg kg}^{-1}$  a  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  (R. Gaxiola-Robles *et al.*, 2014; WHO, 1984). Se ha sugerido que una dieta basada en alimentos de origen marino incrementa la concentración de Hg (Chien *et al.*, 2006), aunque en el presente estudio no se encontró evidencia significativa de ello (Fig. 9). Estudios anteriores en Baja California Sur reportan que el consumo de pescado no contribuye significativamente a la contaminación de la leche materna con Hg (Gaxiola-Robles *et al.*, 2013). De acuerdo con Gundacker y Chien (2002 y 2006), el contenido de vitamina E y Se presente en los alimentos de origen marino ayudan a mantener la concentración de Hg en niveles bajos (Chien *et al.*, 2006; Gundacker *et al.*, 2002), además de proporcionar antioxidantes para evitar un probable daño oxidativo, lo que puede estar ocurriendo con las muestras de leche de las mujeres de Baja California Sur.

### **8.2.3 Selenio**

El Se es un elemento esencial para los seres humanos, forma parte del aminoácido selenocisteína y de las selenoproteínas, las cuales pueden tener función estructural, de transporte, o enzimática (la capacidad de Se de dar y recibir electrones también lo convierten

en un buen centro catalítico (Hardy y Hardy, 2004)). El Se es esencial para la actividad de la enzima GPx, la cual provee una defensa contra el estrés oxidativo catalizando la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de peróxidos orgánicos (Halliwell y Gutteridge, 2007; Hardy y Hardy, 2004). Se sabe que el Se tiene un papel en el mantenimiento del sistema inmune, proporcionando un efecto quimioprotector, sobre todo por ser parte de la enzima GPx y otras selenoproteínas que contribuyen a prevenir el daño oxidativo, lo que lo convierte en un elemento potencialmente preventivo de cáncer (Hardy y Hardy, 2004). Se ha encontrado que este elemento protege contra el daño oxidativo desde la etapa fetal y, aunque el niño nace con reservas de Se, depende de la concentración de éste en la leche materna (Hardy y Hardy, 2004).

La actividad de GPx es mayor en niños alimentados con leche materna en comparación con los bebés alimentados con fórmula, esto se atribuye a que el Se es más fácil de asimilar en su forma orgánica, asociado a proteínas (Dorea, 2002). El contenido de Se en la leche materna depende tanto de las fuentes de Se orgánico (alimentos) como inorgánico (suplementos) de las cuales se alimenta la madre (Dorea, 2002).

Estudios en mujeres de Turquía reportaron una concentración de Se de 68.6 µg L<sup>-1</sup> (Özdemir *et al.*, 2008). La presencia de Se en la leche materna se relacionó con los hábitos alimenticios de las mujeres durante el invierno, especialmente con un alto consumo de carne y conservas de pescado (Özdemir *et al.*, 2008). Otros estudios realizados en mujeres de Ontario, Canadá, presentaron valores de 17.7 µg de Se L<sup>-1</sup> de leche materna (rango de 13 - 25 µg L<sup>-1</sup>) (L'Abbé *et al.*, 1996). Estudios realizados en Brasil (Bianchi *et al.*, 1999) reportan una concentración promedio de Se de 14.06 µg L<sup>-1</sup> de leche materna (intervalo: 10.0 - 24.7 µg L<sup>-1</sup>), no se encontraron correlaciones significativas entre la concentración de Se con el IMC ( $p = 0.74$ ), o el suplemento con Se ( $p = 0.60$ ). Sin embargo, en las personas con alto consumo de pescado se observó una elevación de la concentración de Se en leche materna (Bianchi *et al.*, 1999).

La concentración de Se presentó una correlación significativa con el contenido de proteínas carboniladas y con la actividad de SOD y GPx (Tabla VIII), favoreciendo el sistema

antioxidante presente en la leche. Además, se ha reportado la interacción de Se con otros elementos traza, principalmente Hg, ya sea mediante la formación de un complejo no tóxico de Se y Hg o interviniendo en el proceso de conversión de metilmercurio en mercurio inorgánico (Perottoni *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2008). El contenido de Se puede estar relacionado con la ingesta de alimentos marinos, aunque en el presente estudio no se encontró evidencia significativa de ello (Fig. 9).

#### **8.2.4 Zinc**

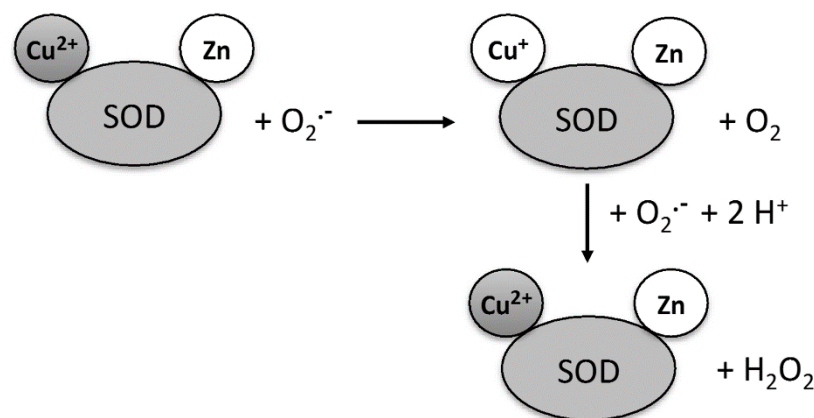
El Zn es parte fundamental de sitios catalíticos de múltiples enzimas. Esto es debido a su fácil transporte y uso, gracias a su estado estable de óxido-reducción. Interviene en el proceso catalítico de alrededor de 100 enzimas. El Zn no solamente es necesario para realizar funciones catalíticas, también interviene a nivel estructural. Este elemento forma parte de la estructura de membranas celulares y ácidos nucleicos, por lo que se considera indispensable para el crecimiento celular (Rosado, 1998).

El Zn se puede encontrar en una gran cantidad de alimentos, pero destacan alimentos de origen animal (carne de res, de cerdo, pollo, pescado, huevos y lácteos). Existen múltiples factores que afectan la biodisponibilidad de este elemento en los alimentos. El contenido de fitato (sal de Mg, Ca, o K del ácido fítico) ingerido es uno de los factores que inhibe la absorción de Zn, debido a su acción quelante. Así mismo, la unión de fitato, Ca y Zn, forman un complejo no absorbible por el organismo, lo que evita la absorción del último. El consumo de proteína de origen animal incrementa la absorción de Zn; algunos autores reportan que los requerimientos de Zn incrementan con la ingesta proteica (López de Romaña *et al.*, 2010a; Norii, 2005). El consumo insuficiente de Zn puede provocar defectos en el sistema nervioso y problemas de crecimiento y desarrollo en etapa fetal y durante los primeros meses de vida (Winiarska-Mieczan, 2014). Otros síntomas causados por deficiencia de este microelemento esencial son pérdida de peso, infecciones, dermatitis, anorexia, diarrea, entre otros (López de Romaña *et al.*, 2010a).

En leche materna, la concentración de Zn disminuye rápidamente desde los primeros días de lactancia, aunque se estabiliza a partir del tercer mes (Dórea, 2012). La deficiencia de Zn

tiene su origen principalmente en la dieta, lo cual se observa especialmente en periodos de crecimiento acelerado, como la infancia y adolescencia. Los grupos más vulnerables a los efectos de una deficiencia en Zn son los lactantes, niños desnutridos, adolescentes, mujeres en embarazo o lactancia, y ancianos (López de Romaña *et al.*, 2010b). Se ha sugerido que los lactantes tienen una baja capacidad para regular la absorción de zinc; por lo general, los niños alimentados con leche materna no sufren de deficiencia de Zn, a excepción de aquellos cuyas madres presentan una deficiencia marcada de este elemento en su organismo y en su dieta (Lönnerdal, 2005). Cuantificar la cantidad de Zn en leche materna es una forma de detectar la concentración presente en las mujeres lactantes, la cual será a su vez transferida a los niños. Algunos autores concluyen que el consumo de suplementos de Zn es útil en el embarazo y lactancia por que incrementa rápidamente la concentración del elemento en el organismo (López de Romaña *et al.*, 2010b). Sin embargo, se ha reportado que el suplemento con Zn inorgánico en la alimentación de mujeres lactantes no incrementa la concentración de Zn en leche materna (Dórea, 2012; Örün *et al.*, 2012).

La concentración de Zn en leche materna reportada por Örün (2012) es de  $625 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $0.625 \text{ mg L}^{-1}$ ), mientras que en el presente estudio se obtuvo una mediana de  $3.66 \text{ mg L}^{-1}$ ; la diferencia puede estar relacionada con el tiempo de lactancia. El trabajo de Örün se llevó a cabo con muestras de leche del segundo mes de lactancia, mientras que en el presente trabajo se utilizaron muestras de la segunda semana de lactancia. De acuerdo con Dórea (2012), el contenido de Zn disminuye durante los primeros tres meses de lactancia. Sin embargo, otros estudios reportan un promedio de  $2.95 \text{ mg L}^{-1}$  de Zn en muestras de leche a los dos meses de lactancia (Dórea, 2012; Khaghani *et al.*, 2010; Örün *et al.*, 2012). Se observó una correlación positiva entre la concentración de Zn y Cu ( $r = 0.54$ ) (Tabla VIII). Es posible que ello se deba a que ambos elementos son cofactores de la enzima SOD, la cual debe tener un aporte de ambos elementos para poder realizar adecuadamente sus funciones antioxidantes, como primer línea de defensa contra las ERO (Halliwell y Gutteridge, 2007). SOD realiza la dismutación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  para dar como producto de la reacción  $\text{H}_2\text{O}_2$ , una especie menos reactiva, que posteriormente será metabolizada por otras enzimas antioxidantes (catalasa y GPx) (Fig. 14) (Franco *et al.*, 2013; Halliwell y Gutteridge, 2007).



**Figura 14.** Reacción de dismutación del radical superóxido catalizada por la enzima superóxido dismutasa (Franco *et al.*, 2013).

### 8.2.5 Hierro

El Fe es un catión que forma parte de la proteína hemoglobina (Hb, cuya función principal es el transporte de oxígeno), es obtenido a partir de la dieta y absorbido por el intestino delgado, aunque sólo se absorbe el 10% de lo ingerido. La absorción óptima del Fe se presenta cuando se encuentra en la forma hemo. Factores como la presencia de fitatos y taninos en los alimentos disminuyen su absorción, mientras que el contenido de vitamina C incrementa la absorción de Fe.

El contenido de Fe en leche, así como los niveles de lactoferrina, varían con la etapa de lactancia y la hora del día (Faridi *et al.*, 2006). El niño, desde el nacimiento, dispone de dos fuentes de Fe, aquel ligado a la lactoferrina y el hierro no hemo; la mayor parte del hierro contenido en leche materna se encuentra unido a lactoferrina (Lönnerdal, 2005). En los primeros días de vida del lactante no existe una regulación de los niveles de Fe; la ingesta de leche materna es importante debido a su contenido de lactoferrina que permite una adecuada absorción de Fe y, así, evitar la presencia de patologías tales como la anemia (Lönnerdal, 2005). La demanda de Fe es mayor en etapas de rápido crecimiento, como la infancia y la



adolescencia. La anemia, causada por una cantidad insuficiente de Fe para la formación de Hb, puede afectar a individuos tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. En el presente estudio se observó una concentración de  $0.46 \text{ mg L}^{-1}$  de Fe en leche materna, por debajo del promedio de  $0.85 \text{ mg L}^{-1}$  reportado por Mahdavi (2010) en una investigación realizada en mujeres lactantes de Irán. Las diferencias en el contenido de Fe entre estos estudios se deben presumiblemente a diferencias en la alimentación entre países. En el presente estudio, también se observó una relación negativa entre las concentraciones de Fe y Cd ( $r = -0.27$ ). Se ha reportado que la concentración de Cd en el organismo es afectada por la presencia de micronutrientes como Fe, Cu, entre otros (McLaughlin *et al.*, 1999).

La transferrina es la proteína responsable del transporte de Fe, y la ferritina de su almacenaje, evitando la presencia de Fe libre; ambas proteínas se han encontrado en leche materna (Levy y Viljoen, 1995). El Fe interviene en la producción de ERO, participando en procesos como la reacción de Fenton, en la cual  $\text{O}_2^{\cdot-}$  reduce al Fe transformándolo de férrico a ferroso ( $+3 \rightarrow +2$ ), el  $\text{Fe}^{+2}$  reduce al  $\text{H}_2\text{O}_2$  originando el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Barja, 1997). La producción de ERO incrementa el daño oxidativo a lípidos; por lo tanto, se explica la correlación positiva entre las concentraciones de Fe y de TBARS ( $r = 0.2$ ) encontrada en el presente estudio (Tabla VIII).

### 8.2.6 Cobre

El Cu es considerado un elemento esencial porque interviene como cofactor de múltiples enzimas, entre las que se incluye a la superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn (Cu,Zn-SOD). Además, este elemento es necesario para la formación de huesos y mielina, así como la síntesis de Hb (Gaetke y Chow, 2003; Winiarska-Mieczan, 2014). El Cu puede ser liberado al ambiente por fuentes naturales (emisiones volcánicas, vientos, incendios forestales) o por acción del hombre (fundición metálica, producción de acero, incineraciones). El agua para beber tiene un aporte de Cu de entre 6 y 13%, con un límite máximo de  $1.3 \text{ mg L}^{-1}$  de acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos (Gaetke y Chow, 2003).

La absorción del Cu depende del ligando que utilice para su transporte. Cuando se une a aminoácidos como histidina, metionina y cisteína puede utilizar el sistema de transporte de aminoácidos; la absorción aumenta cuando la unión es entre el Cu y GSH o entre Cu y ácidos orgánicos. Sin embargo, la presencia de iones de Zn, Fe, Mo, Ca, P e incluso vitamina C pueden afectar su absorción (Gaetke y Chow, 2003). En ocasiones, se recomiendan suplementos de Fe a los niños lactantes; sin embargo, la ingesta de Fe puede reducir la absorción de Cu (Domellöf *et al.*, 2005). Existen pocos informes sobre la toxicidad del Cu en lactantes, lo que se atribuye a una adecuada regulación de la homeostasis del Cu a una edad temprana, al contrario del Fe y del Zn (Lönnerdal, 2005).

En el presente estudio se encontró una concentración de Cu en leche materna de  $0.59 \text{ mg L}^{-1}$ ; resultados similares se han reportado en estudios anteriores (Khaghani *et al.*, 2010; Mahdavi *et al.*, 2010). La oxidación de proteínas por presencia de Cu libre explica la correlación observada en este trabajo entre las concentraciones de Cu y de proteínas carboniladas ( $r = 0.2$ ). El Cu puede participar en la reacción de Fenton, sustituyendo al Fe. El cobre pasa de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$ , con la consecuente reducción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\cdot\text{OH}$ , un compuesto aún más reactivo (Barja, 1997). Esto incrementa la probabilidad de daño oxidativo a lípidos y proteínas. El aminoácido cisteína se oxida en presencia de metales de transición, como es el caso de Fe y Cu, produciendo un aumento en la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Kim *et al.*, 2001). Algunas proteínas como la ceruloplasmina, que es una proteína transportadora de Cu, se unen al metal libre, disminuyendo su disponibilidad para participar en la reacción de Fenton y con ello evitar el daño oxidativo (Kim *et al.*, 2001).

### **8.2.7 Cadmio**

El Cd se transfiere desde el suelo hacia las plantas; es decir, hacia los alimentos de origen vegetal que, posteriormente, son consumidos por distintos animales. Una vez dentro del organismo, el Cd se deposita tanto en hígado como en riñones (Winiarska-Mieczan, 2014). En los últimos años se ha incrementado la emisión de Cd al ambiente debido a actividades antropogénicas, liberando una concentración de Cd por encima de las fuentes naturales. El

Cd, al no ser degradado en el ambiente, es bioacumulado a lo largo de la cadena trófica; el ser humano, por lo tanto, está expuesto a una mayor cantidad de Cd (Cuypers *et al.*, 2010). El humo del cigarro es una de las principales fuentes de contaminación por Cd; sin embargo, los alimentos son la fuente de contaminación principal en la población no fumadora (Järup, 2003). El daño provocado por Cd puede afectar hígado, riñones, páncreas, pulmones, entre otros (Cuypers *et al.*, 2010). La toxicidad de este elemento se agrava en el caso de los niños debido a una lenta eliminación, pudiendo afectar el sistema nervioso, la formación de huesos, e incluso puede ser cancerígeno (Winiarska-Mieczan, 2014). Por lo tanto, es relevante conocer la concentración de Cd transferida a través de la leche materna a los lactantes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado un límite de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd en leche (Cherkani-Hassani *et al.*, 2015). En el presente estudio se encontró una mediana de  $0.01 \mu\text{g Cd L}^{-1}$ , que está por debajo de los límites permitidos establecidos por la OMS.

En el presente estudio se encontró una correlación negativa entre las concentraciones de Cd y Fe ( $r = -0.27$ ). Ello concuerda con la relación inversa entre la concentración de Cd y la de microelementos como Fe reportada previamente (Cuypers *et al.*, 2010; McLaughlin *et al.*, 1999).

En este estudio, se encontró una correlación positiva entre la concentración de Cd y la actividad de GPx ( $r = 0.22$ ). Se asume que puede haber un incremento en la actividad de la enzima antioxidante, para evitar el daño provocado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y/o otros peróxidos orgánicos productos de la oxidación lipídica inducida por Cd. Parte del daño provocado por Cd está asociado al estado óxido-reducción de la célula. El Cd tiene la capacidad de sustituir al Fe en la estructura proteica y es responsable del incremento de la concentración de Fe libre. Este último, mediante la reacción de Fenton, puede producir radicales libres como  $\cdot\text{OH}$  (Cuypers *et al.*, 2010). Por otra parte, el Cd se une a los grupos tiol, incluido el GSH, el cual al parecer es uno de sus principales objetivos. La unión del Cd al grupo sulfhidrilo provoca la disminución de GSH funcional, afectando su acción antioxidante y, por ende, potencialmente el balance antioxidante-prooxidante de la célula (Cuypers *et al.*, 2010). El Cd puede inducir oxidación de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La lipoperoxidación inducida por Cd afecta el hígado y al cerebro debido a incrementos en la liberación de MDA (Arroyo, 2014).

La exposición prolongada al Cd puede incrementar la producción de ERO, afectando las defensas antioxidantes, provocando daño a nivel de células y tejidos (Arroyo, 2014 ).

### 8.2.8 Plomo

La contaminación por Pb puede ser a través del aire o por medio de los alimentos. En la actualidad, las emisiones de Pb al ambiente a partir de combustibles, son una importante fuente de exposición (Järup, 2003). Los adultos pueden tomar entre el 10 y el 15 % de Pb presente en los alimentos, mientras que los niños pueden absorber hasta un 50% a través del tracto gastrointestinal. Una vez que el Pb entra al organismo se une a los eritrocitos, para proceder con una lenta eliminación de aproximadamente un mes, principalmente a través de la orina (WHO, 1995). El Pb inorgánico no penetra en la barrera hematoencefálica en adultos, mientras que esta barrera está menos desarrollada en los niños, por lo que el Pb puede provocar daño cerebral. Compuestos orgánicos de Pb como tetrametilo y tetraetil, penetran piel, membranas celulares, así como la barrera hematoencefálica en niños y adultos. Parte del Pb puede ser acumulado en sistema el óseo donde puede permanecer de 20 a 35 años (Järup, 2003; WHO, 1995).

En este trabajo se reportó una mediana de  $2.61 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb en leche materna. La OMS estableció un límite permisible de Pb de  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$  en alimentos para lactantes (Marques *et al.*, 2013); por lo tanto, los resultados del presente estudio se encuentran dentro de los límites permitidos. Se ha sugerido un efecto antagónico de Pb y Cd con Zn y Cu principalmente por competencia por los sitios activos enzimáticos, principalmente por su afinidad por los grupos sulfhidrilo (Ercal *et al.*, 2001; Pizent *et al.*, 2003). En el presente trabajo sólo se observó una correlación inversa entre Pb y Se ( $r = -0.24$ ), así como entre Cd y Fe ( $r = -0.27$ ). Aunque la relación entre los elementos no es muy clara, se sabe que, tanto Pb como Cd incrementan la producción de especies reactivas y en consecuencia incrementan la oxidación de moléculas biológicas (Cuyper *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2008). En contraste, Se y Fe son cofactores de enzimas antioxidantes (Hardy y Hardy, 2004; Meier, 1991), cuya función es evitar la oxidación de lípidos, proteínas y ADN.

El Pb puede inducir lipoperoxidación; el grado de oxidación está directamente relacionado con el número de dobles enlaces presentes en los lípidos. Esto puede afectar la integridad y funcionalidad de las membranas celulares (Ercal *et al.*, 2001). La presencia de altas concentraciones de Pb afecta la actividad de enzimas antioxidantes como GR, GPx y catalasa. El Pb, al igual que otros metales, tiene afinidad por los grupos tiol; al unirse al grupo tiol del GSH afecta su actividad negativamente, así como la actividad de las enzimas antioxidantes (GPx y GST) que lo utilizan como donante de protones (Ercal *et al.*, 2001). También afecta la actividad de GR, ya que el Pb obstaculiza el enlace disulfuro, al unirse al grupo tiol, evitando la reducción del GSSG a GSH, disminuyendo la concentración de GSH disponible (Ercal *et al.*, 2001). Se ha reportado también que Pb forma un complejo con Se; por consiguiente, la concentración de Se libre se reduce (Ercal *et al.*, 2001). Dado que el Se es un cofactor necesario para la actividad de la selenoproteína GPx, la actividad de ésta es afectada de forma indirecta por Pb. Catalasa es otra enzima antioxidante cuya actividad disminuye en presencia de Pb, debido a que éste inhibe la síntesis del grupo hemo, necesario en la estructura de dicha enzima (Ercal *et al.*, 2001).

### **8.2.9 Carbonilos proteicos e indicadores de estrés oxidativo**

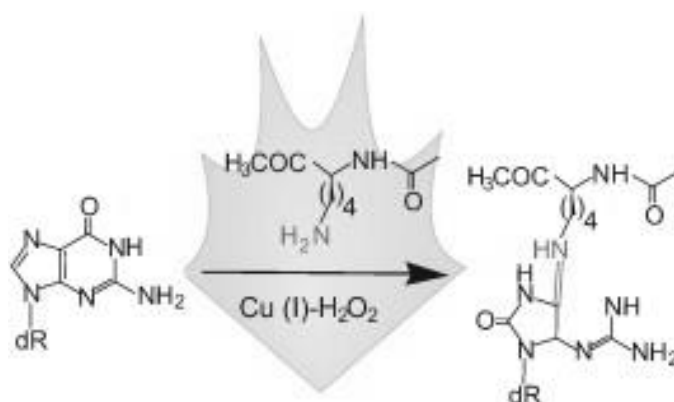
El contenido de carbonilos proteicos puede ser un buen indicador de daño oxidativo en leche materna. De acuerdo al GLM, la actividad de GPx y GR, así como las concentraciones de Se, Cd y Pb parecen estar directamente relacionadas con la concentración de carbonilos proteicos en leche materna (Tabla X). La concentración de carbonilos proteicos se ha relacionado con indicadores de estrés oxidativo, tales como la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de moléculas prooxidantes (Yelinova *et al.*, 1996). Aparentemente, las enzimas, GPx y GR son las principales responsables de prevenir la oxidación inducida por Pb y Cd (Halliwell y Gutteridge, 2007). La concentración de Se está relacionada a la actividad de GPx, por ser el cofactor de esta enzima ( $r = -0.24$ ,  $p < 0.05$ ) (Hardy y Hardy, 2004). Cd y Pb brindan información al modelo; sin embargo, los resultados obtenidos se deben tomar con reservas debido a la baja proporción de datos detectados (Farnham *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la actividad de GPx en leche de madres fumadoras es de  $105.1 \text{ U L}^{-1}$  (aproximadamente  $0.012 \text{ U mg}^{-1}$  proteína, asumiendo  $9 \text{ g L}^{-1}$  de leche materna), mientras

que en las madres no fumadoras la actividad reportada fue de  $90.8 \text{ U L}^{-1}$  (aproximadamente  $0.010 \text{ U mg}^{-1}$ ); los autores atribuyen la diferencia a la concentración de Cd presente en el cigarro (Ermis *et al.*, 2005). Además, se ha reportado un incremento en la actividad de GPx (79%) en relación a bajas concentraciones de Pb ( $p < 0.001$ ) en eritrocitos humanos, lo contrario ocurre a altas concentraciones de Pb; por lo tanto, existe una relación entre estos elementos y la actividad de GPx (Kasperczyk *et al.*, 2004). La concentración de Pb y Cd afecta la actividad de GPx, ya que pueden unirse a los grupos tiol del GSH (necesario para las reacciones de GPx), además Pb forma un complejo con Se, disminuyendo la concentración de Se libre parte fundamental de la estructura de la selenoproteína (Ercal *et al.*, 2001); esto interfiere con su acción antioxidante e incrementa el riesgo de oxidación de proteínas por ERO.

### **8.3 Daño oxidativo a ADN**

Una de las principales causas del envejecimiento celular y el inicio de varias patologías, incluyendo el cáncer, es el daño oxidativo al ADN (Fraga *et al.*, 1990). La concentración de 8-oxo-dG se ha utilizado como indicador de daño oxidativo al ADN; este compuesto se produce cuando las ERO reaccionan con desoxiguanosina (dG) en el ADN o cuando reacciona con trifosfato de desoxiguanosina en un conjunto de nucleótidos (Hayakawa *et al.*, 1995; Nakabeppu *et al.*, 2006). El daño oxidativo al ADN puede originarse tanto por exposición a sustancias xenobióticas como a sustancias endógenas oxidantes como ERO (Fig. 15) (Mikołajewska *et al.*, 2016). Altas concentraciones de 8-oxo-dG en ADN se han relacionado a una mayor probabilidad de mutagénesis y carcinogénesis (Vulimiri *et al.*, 2000).



**Figura 15.** Reacción de oxidación de 2'-desoxiguanosina a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina. La 2'-desoxiguanosina es oxidada por especies reactivas de oxígeno generadas por cobre (Cu (I)) (Solivio *et al.*, 2010).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio en la prueba de Kruskal-Wallis, la alimentación, ocupación, el número de amalgamas y el hábito de fumar de las mujeres, no son factores relevantes en el daño oxidativo al ADN ( $p > 0.05$ ) (Tabla XIII). Por otra parte, en los resultados de la tabla de coeficientes de correlación de Spearman (Tabla XII), se observó una correlación significativa ( $r = -0.36$ ,  $p < 0.05$ ) entre los niveles de 8-oxo-dG en sangre y la concentración de Hg en leche materna. El Hg es un metal tóxico que puede provocar problemas neurológicos, cardiacos, entre otros (Clarkson *et al.*, 2003). Generalmente los problemas provocados por Hg están relacionados con la generación de ERO y alteraciones del sistema antioxidante. En el proceso de desintoxicación de Hg intervienen principalmente GSH, metalotioneínas, Se, así como selenoproteínas como GPx (Hussain *et al.*, 1999). Algunos metales como Fe, Cu, Cr y Va intervienen en ciclos de óxido-reducción, por otra parte, otros elementos como Cd, Hg y Pb disminuyen la concentración de GSH disponible, afectando a los grupos sulfhidrilo, incluso aquellos grupos unidos a proteínas. Lo anterior favorece el incremento de ERO y en consecuencia también al daño oxidativo (Stohs y Bagchi, 1995). Trabajos recientes han señalado que después de la exposición a Hg, se presentan problemas en el estado redox de la célula, así como daño en ADN (Chen *et al.*, 2005; Stohs y Bagchi, 1995). Chen *et al.* (2005) realizaron un estudio en una población expuesta a Hg (Wanshan, China) con 13 residentes del área de Wanshan y 35

trabajadores con exposición ocupacional a Hg (32-66 años), 35 residentes sanos de una región no contaminada de Pekín fueron el grupo control (, 28-64 años). Se cuantificó Hg en muestras de sangre y 8-oxo-dG en muestras de orina, reportando una relación entre las concentraciones del indicador de daño oxidativo con relación a la concentración de Hg ( $r = 0.616$ ,  $p = 0.001$ ), así como diferencias en la concentración de 8-oxo-dG entre el grupo expuesto y el grupo control ( $287.8 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $2.28 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $p < 0.01$ ). También se registraron correlaciones entre en la concentración de 8-oxo-dG y la actividad antioxidante enzimática (SOD y GPx) ( $r = 0.89$ ,  $p < 0.001$  y  $r = 0.795$ ,  $p < 0.05$ ) (Chen *et al.*, 2005). En este mismo estudio se sugiere que esta relación podrían ser una respuesta compensatoria de las células al daño oxidativo provocado por Hg (Chen *et al.*, 2005). Por otra parte, Hossain et al. (2014) determinaron las concentraciones de Cd, Hg y Pb en riñón, así como su posible asociación con el daño oxidativo a ADN. Se cuantificó el contenido de 8-oxo- dG en muestras de orina, de adultos sanos, en Suecia. No se encontró relación entre las concentraciones de 8-oxo-dG y el contenido de los metales medidos en el riñón. Por lo tanto, Hg, Cd y Pb no contribuyeron a las concentraciones de 8-oxo-dG en sujetos sin exposición ocupacional, de acuerdo con este estudio (Hossain *et al.*, 2014)

Los POCs son considerados estrógenos exógenos, o xenoestrógenos, por que simulan la acción de las hormonas o interfieren con las vías de las hormonas endógenas (Dey *et al.*, 2010). Estudios en mujeres de Egipto, encontraron una mayor incidencia de cáncer de mama en poblaciones urbanas, relacionada con una mayor exposición a los xenoestrógenos, así como a otros disruptores endócrinos y sustancias genotóxicas (Dey *et al.*, 2010). Algunos estudios sugieren que la presencia de POCs y el incremento del daño al ADN, representado como 8-oxo-dG, puede ser un bioindicador de desarrollo de cáncer; por ejemplo, cáncer de mama (Charles *et al.*, 2001). Sin embargo, otros autores no han observado diferencias significativas en los niveles de 8-oxo-dG en tejido canceroso, comparado con tejido no canceroso, y no han demostrado una relación clara entre los niveles de POCs y el contenido de 8-oxo-dG (Charles *et al.*, 2001; Dey *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Ziech *et al.*, 2010). De acuerdo con los resultados del presente estudio, no se encontró asociación entre el contenido de POCs y el daño oxidativo a ADN (Tabla XII), por otra parte, se encontró una baja



correlación entre el daño oxidativo a lípidos y proteínas y la concentración de plaguicidas ( $r < 0.26$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabla V). Así como relaciones significativas entre la actividad de las enzimas antioxidantes y la concentración de los POCs analizados en muestras de leche materna (Tabla V). La poca influencia que los plaguicidas ejercen a nivel oxidativo puede deberse principalmente a la acción de los antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos). Por otro lado, específicamente en el ADN, también pueden estar realizando su función correctamente, los mecanismos de reparación (Enríquez *et al.*, 2011).

Los valores reportados para 8-oxo-dG en este estudio son  $1.27 \text{ ng mL}^{-1}$  (p25 = 0.66 y p75 =  $2.52 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (Tabla XI). Sin embargo, no fue posible encontrar un valor de referencia para declarar si los resultados obtenidos son valores altos o bajos. Después de revisar la literatura, se encontraron diferencias en la escala de valores con respecto al contenido de 8-oxo-dG; esto puede deberse a diferencias en el método utilizado para la cuantificación, en el tipo de muestra, a las características de los sujetos que participaron en los estudios, entre otras razones. A continuación, se presentan algunas investigaciones donde se reporta el contenido de 8-oxo-dG como indicador de daño oxidativo a ADN, en unidades similares a las presentadas en este estudio.

La producción de ERO se lleva a cabo como consecuencia del metabolismo celular normal, aunque parece incrementarse en condiciones de mayor actividad física lo que conlleva a un mayor daño oxidativo (Bloomer *et al.*, 2005). Estudios realizados en Suecia, midieron los niveles séricos de 8-oxo-dG en 15 sujetos sanos, antes y después de realizar 20 minutos de ejercicio físico intenso. Se reportaron valores basales de 8-oxo-dG de  $0.52 \pm 0.11 \text{ ng mL}^{-1}$  y valores de  $0.83 \pm 0.16$  y  $0.39 \pm 0.06 \text{ ng mL}^{-1}$ , en deportistas que no consumieron y que consumieron jugo de tomate con antioxidantes (licopeno) durante 5 semanas. Los resultados reportan que la ingesta diaria de jugo de tomate por 5 semanas reduce los niveles de 8-oxo-dG en suero sanguíneo después del ejercicio físico (Harms-Ringdahl *et al.*, 2012). Se realizó otro estudio con muestras de sangre de diez sujetos sanos tomadas antes y después del entrenamiento físico ( $24.3 \pm 3.8$  años). A pesar de las variaciones en el contenido de proteínas carboniladas, GSH y MDA, las concentraciones reportadas en este estudio presentaron una

concentración constante de 8-oxo-dG de  $6 \text{ ng mL}^{-1}$  antes y después del ejercicio físico (Bloomer *et al.*, 2005).

De acuerdo con Vulimiri *et al.* (2000) un alto contenido de 8-oxo-dG en ADN puede ser un indicador de mutagénesis y carcinogénesis (Vulimiri *et al.*, 2000). Berstein *et al.* (2016) realizaron un análisis comparativo entre pacientes con cáncer de mama y cáncer de endometrio, los niveles sanguíneos de 8-oxo-dG reportados en pacientes con cáncer de mamá, fueron de  $31.25 \pm 1.57 \text{ ng mL}^{-1}$  y en pacientes con cáncer de endometrio fueron de  $30.86 \pm 0.94 \text{ ng mL}^{-1}$  (Berstein *et al.*, 2016)

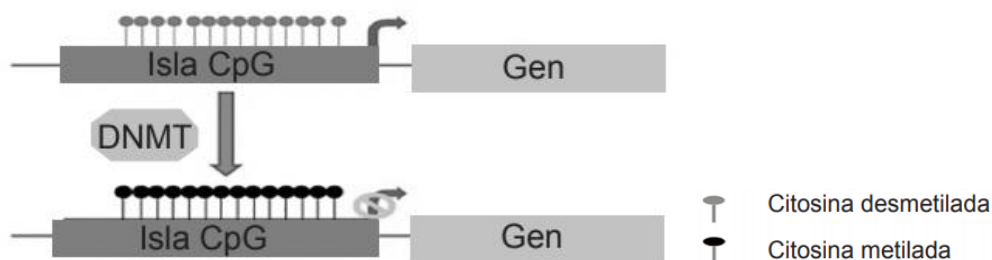
Diversos estudios han presentado al 8-oxo-dG como biomarcador de daño oxidativo relacionado con enfermedades cardiacas. Himmetoglu *et al.* (2009) realizaron estudios en pacientes con infarto de miocardio, Los resultados del estudio reportan diferencias en la concentración de 8-oxo-dG entre individuos con infarto de miocardio e individuos control ( $12.65 \pm 6.59$  y  $3.08 \pm 1.06 \text{ ng mL}^{-1}$  respectivamente,  $p < 0.001$ ). De acuerdo con Himmetoglu, el tiempo de recuperación de los pacientes estuvo relacionado con una disminución en la concentración sérica de 8-oxo-dG (Himmetoglu *et al.*, 2009). Otro estudio donde participaron sujetos con problemas cardiovasculares fue realizado por Arca *et al.* (2008) con 237 pacientes con estenosis coronaria. No se observaron diferencias significativas en el contenido de 8-oxo-dG, entre el grupo con eventos cardiovasculares mayores y el grupo control ( $4.86 \pm 1.48$  y  $4.48 \pm 1.11 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $p = 0.084$ ) (Arca *et al.*, 2008). Xiang *et al.* (2011) encontraron una asociación positiva entre el aumento de 8-oxo-dG y el número de vasos sanguíneos enfermos, en estudios donde participaron 127 pacientes con sospecha de enfermedad cardiaca. Los niveles de 8-oxo-dG en suero en pacientes con enfermedad cardiaca fueron significativamente más altos, que en pacientes con arterias coronarias normales ( $0.41 (0.30-0.57) \text{ ng mL}^{-1}$  y  $0.32 (0.25-0.43) \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $p = 0.001$ ) (Xiang *et al.*, 2011). El daño oxidativo en ADN también ha sido implicado en problemas de insuficiencia cardíaca crónica. Kono *et al.* (2006) midieron los niveles séricos de 8-oxo-dG en 56 pacientes con miocardiopatía dilatada y en 20 sujetos de control. Los pacientes con miocardiopatía presentaron niveles séricos elevados de 8-oxo-dG en comparación con los sujetos control ( $5.2 \pm 2.9 \text{ ng mL}^{-1}$  y  $3.0 \pm 1.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ,  $p = 0.0018$ ) (Kono *et al.*, 2006).

De acuerdo con los trabajos anteriores, los valores reportados para 8-oxo-dG en este estudio, estarían por encima de los reportados por Harms et al. (2012) para sujetos en estado basal e incluso después del ejercicio físico, lo que se contrapone por lo reportado por Bloomer et al. (2005), quien reporta valores más altos (Bloomer *et al.*, 2005; Harms-Ringdahl *et al.*, 2012). Por otro lado, los datos publicados por Berstein et al. (2016) para mujeres con cáncer de mama y endometrio, son aproximadamente 25 veces mayores que la media reportada en el presente estudio, lo cual sugiere que las mujeres de este estudio no presentan este tipo de problemas de salud (Berstein *et al.*, 2016). Con relación a los problemas cardiovasculares, Himmetoglu et al. (2009) y Kono et al. (2006) presentan valores para sujetos sanos similares a los reportados en este trabajo, caso contrario sucede con los valores reportados por Xiang et al. (2011) quien presenta valores más bajos (Himmetoglu *et al.*, 2009; Kono *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2011). Sin embargo, ninguna de las mujeres de este estudio declaró tener problemas cardiacos.

Por lo tanto, las concentraciones de 8-oxo-dG presentadas en este estudio parecen estar dentro del rango reportado para personas sanas; el daño oxidativo al parecer no está relacionado con el contenido de POCs, si no de elementos traza, específicamente Hg (Tabla XII). Sin embargo, las concentraciones de Hg reportadas en este trabajo (Tabla VII) están dentro de los límites establecidos por la OMS (WHO, 1984), lo que coincide con los bajos niveles de daño oxidativo a ADN.

#### **8.4 Metilación del gen *GSTP1***

La metilación del ADN es parte de los mecanismos epigenéticos que participan en el control de la expresión génica; los estados de metilación pueden ser heredables y se adaptan para una función de memoria celular (Widschwendter y Jones, 2002).



**Figura 16.** Mecanismo de silenciamiento de genes por metilación, asociada a la represión transcripcional. Las enzimas ADN-metiltransferasas (DNMT) metilan sitios CpG, asociadas a promotores de genes (Ríos-Romero *et al.*, 2015).

La metilación de las islas CpG (regiones con 55% de dinucleótidos CG, representan el 1% del genoma) consiste en la transferencia de grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) a las bases citosina del ADN adyacentes a una guanina. Estas islas se concentran especialmente en la región promotora de los genes, su hipermetilación restringe o impide la transcripción de ARN mensajero y de la expresión proteica (Fig. 16) (Ríos-Romero *et al.*, 2015).

La presencia de algunos elementos traza en la dieta se ha asociado con alteraciones en los patrones de metilación del ADN; la exposición a altas concentraciones de elementos como Cd, Cr, Ni, As y Hg, provoca hipometilación y/o hipermetilación de ADN (Haluskova *et al.*, 2015; Rodriguez y Alvarez-Castañeda, 2014). Estos cambios en el estado de metilación se han asociado con varios tipos de cáncer (Gumy-Pause *et al.*, 2012). Se ha sugerido que la metilación del promotor del gen *GSTP1* está asociado con el aumento en la toxicidad del Pb; sin embargo, los resultados no son concluyentes, por lo menos durante la etapa temprana de envenenamiento por Pb (Li *et al.*, 2014).

El gen *GSTP1* codifica para la producción de la enzima GST; las *glutación S-transferasas* son una superfamilia de genes, responsables de la detoxificación de xenobióticos (Parl, 2005). Se ha demostrado que la hipermetilación del gen *GSTP1* se encuentra vinculado a un decremento en la expresión del mRNA (Lin *et al.*, 2001); y en la consecuente expresión de proteínas; por lo tanto, la hipermetilación produce la subexpresión de *GSTP1* (Gumy-Pause *et al.*, 2012). Esto se ha relacionado a la presencia y acumulación de elementos cancerígenos en el organismo y a distintos tipos de cáncer (Rodriguez y Alvarez-Castañeda, 2014). La hipermetilación del gen *GSTP1* en ratones se asoció a un aumento en la tumorigénesis de la

piel (Henderson *et al.*, 1998). Además se ha relacionado la metilación del promotor del gen *GSTP1* con la inactivación de genes en el 30% de los carcinomas presentes en mujeres con cáncer de mama (Widschwendter y Jones, 2002).

Shinozaki (2005) sugirió que la hipermetilación del gen *GSTP1* puede ser un factor pronóstico de algunos tipos de cáncer, encontró una correlación entre la metilación del gen y el tamaño de los tumores, así como un incremento de la probabilidad de metástasis del ganglio centinela (primer ganglio linfático que se encuentra en las células tumorales). La pérdida del gen *GSTP1* afecta el sistema de defensa celular que interviene en la desintoxicación de xenobióticos electrófilos, los cuales incluyen agentes carcinógenos involucrados en distintos tipos de cáncer, aumentando el daño en el genoma y la consecuente evolución del proceso cancerígeno (Shinozaki *et al.*, 2005).

La hipermetilación del gen *GSTP1* puede ser utilizada como biomarcador de diferentes tipos de cáncer; lo que permite su detección temprana (Dumache *et al.*, 2009; Widschwendter y Jones, 2002). La hipermetilación en la región promotora del gen *GSTP1* es una alteración en el ADN común en casos de cáncer de próstata (Dumache *et al.*, 2009). También la metilación genética puede utilizarse para la detección temprana de cáncer de mama o de cambios premalignos (Widschwendter y Jones, 2002).

En el presente estudio, las concentraciones de elementos traza cuantificadas se encuentran dentro de los límites establecidos (Tabla VII). Esto, aunado a que no se encontró un estado hipermetilado del gen *GSTP1*, indica una adecuada expresión de la enzima GST. Dado que GST contribuye a la detoxificación de xenobióticos cancerígenos y a disminuir el daño oxidativo (Halliwell y Gutteridge, 2007; Parl, 2005), los resultados del presente estudio sugieren una probabilidad baja de que las mujeres muestreadas desarrollen algún tipo de cáncer asociado a la metilación del gen *GSTP1*, especialmente cáncer de mama.

## 9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se detectó la presencia de 21 plaguicidas en leche materna. El DDE, metabolito del DDT, se detectó en todas las muestras de leche. Sin embargo, y de acuerdo a la relación DDE/DDT, la exposición a DDT no es reciente y se espera una tendencia a que esta relación disminuya en el futuro.

Se cuantificaron los elementos traza Se, Hg, As, Zn, Fe, Cu, Cd y Pb. La concentración de elementos traza considerados tóxicos (As, Hg, Pb y Cd) no sobrepasó los límites permisibles establecidos por la OMS y EPA. La concentración de 8-oxo-dG se correlacionó con el contenido de Hg ( $r = -0.36$ ,  $p < 0.05$ ), sin embargo, los valores reportados se encuentran dentro del rango reportado para personas sanas.

La presencia de xenobióticos se ha relacionado con el incremento en la producción de ERO. Sin embargo, no se encontró una correlación entre la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y la concentración de POCs o elementos traza en leche materna. No se descarta la posibilidad de un incremento en otras ERO no cuantificadas en este estudio. Se observó una baja correlación entre los niveles de TBARS, carbonilos proteicos, 8-oxo-dG y la concentración de POCs ( $r < 0.40$ ,  $p < 0.05$ ), y elementos traza ( $r < 0.40$ ,  $p < 0.05$ ). Lo anterior sugiere que la actividad antioxidante de SOD, GPx, GST y GR contribuye a neutralizar las ERO y a prevenir el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN.

El consumo de pescados y mariscos no fue un factor determinante en el nivel de contaminación de la leche materna por POCs o elementos traza. Se sugiere que el contenido de proteínas, vitaminas, minerales y antioxidantes en los alimentos de origen marino son elevados y proporcionan beneficios adicionales.

Se encontró un estado no metilado en el gen *GSTP1* de las mujeres de Baja California Sur. Esto puede estar relacionado con las concentraciones relativamente bajas de xenobióticos presentes en estas mujeres, que se reflejan en la leche. El estado no metilado del gen *GSTP1* indica una correcta expresión de la enzima y su participación en los mecanismos de detoxificación.

## 10. LITERATURA CITADA

Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-126.

Agarwal, A., A. Aponte-Mellado, B.J. Premkumar, A. Shaman, S. Gupta. 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol.* 10:49.

Ahmed, R.S., V. Seth, S. Pasha, B. Banerjee. 2000. Influence of dietary ginger (*Zingiber officinales Rosc*) on oxidative stress induced by malathion in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 38:443-450.

Al-Awadi, F.M., T.S. Srikumar. 2000. Trace-element status in milk and plasma of Kuwaiti and non-Kuwaiti lactating mothers. *Nutrition.* 16:1069-1073.

Al-Saleh, I., N. Shinwari, A. Mashhour. 2003. Heavy metal concentrations in the breast milk of Saudi women. *Biological trace element research.* 96:21-37.

Albert, L. 1981. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna y riesgo para la salud. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 91:15.

Albin, N., L. Massaad, C. Toussaint, M.C. Mathieu, J. Morizet, O. Parise, A. Gouyette, G.G. Chabot. 1993. Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues. *Cancer research.* 53: 3541-3546.

Alonso, D.L., S. Latorre, E. Castillo, P.F. Brandão. 2014. Environmental occurrence of arsenic in Colombia: A review. *Environmental Pollution.* 186:272-281.

Alloway, B. 2013. Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. *Heavy metals in soils. Environ. Pollut.* 22.

Anderson, H.A., M.S. Wolff. 2000. Environmental contaminants in human milk. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 10:755-760.

Androutsopoulos, V. P., A.F. Hernandez, J. Liesivuori, A.M. Tsatsakis. 2013. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology.* 307: 89-94.

Arca, M., B. Conti, A. Montali, P. Pignatelli, F. Campagna, F. Barillà, G. Tanzilli, R. Verna, A. Vestri, C. Gaudio. 2008. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22phox and recurrence of cardiovascular events in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:752-757.

Arroyo, V. S. 2014 . Efecto del cadmio en la progresión del daño hepático en Esteatosis (Maestría). Universidad Autónoma Metropolitana, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. 1-94.

Atsdr, U. 2007. Toxicological profile for arsenic. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Division of Toxicology, Atlanta, GA.

Aulakh, R., J. Bedi, J. Gill, B. Joia, P. Pooni, J. Sharma. 2007. Occurrence of DDT and HCH insecticide residues in human biopsy adipose tissues in Punjab, India. *Bull Environ Contam Toxicol.* 78:330-334.

Ávila, R., S.R. Gemio. 2011. Resíduos de plaguicidas organoclorados en leche materna. *Rev. Bol. Quim.* 28:22.

Azeredo, A., J.P. Torres, M. de Freitas Fonseca, J.L. Britto, W.R. Bastos, C.E.A. e Silva, G. Cavalcanti, R.O. Meire, P.N. Sarcinelli, L. Claudio. 2008. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. *Chemosphere*, 73:246-251.

Bánfalvi, G. 2011. Heavy metals, trace elements and their cellular effects. En Bánfalvi, G (ed.). *Cellular Effects of Heavy Metals*. Editotial Springer. Nueva York, NY. EUA. pp 3-28.

Barja, G. 1997. Radicales libres y antioxidantes. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Biología. 40p.

Barouki, R., J.P. Antignac, C. Emond, K. Clément, L. Birnbaum, M. La Merrill, M.J. Kim. 2015. Tejido adiposo, agentes contaminantes y obesidad. <http://ebook.ecog-obesity.eu/chapter-biology/adipose-tissue-pollutants-obesity/>

Behrooz, R.D., A. Esmaili-Sari, F.E. Peer, M. Amini. 2012. Mercury concentration in the breast milk of Iranian women. *Biol. Trace Elem. Res.* 147:36-43.

Berstein, L.M., T.E. Poroshina, I.M. Kovalenko, D.A Vasilyev. 2016. Serum Levels of 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine DNA in Patients with Breast Cancer and Endometrial Cancer with and without Diabetes Mellitus. *Bull Exp Biol Med.* 161:547-549.

Bianchi, M., A. Cruz, M. Zanetti, J. Dore. 1999. Dietary intake of selenium and its concentration in breast milk. *Biol. Trace Elem. Res.* 70:273-277.

Bloomer, R.J., A.H. Goldfarb, L. Wideman, M.J. McKenzie, L.A. Consitt, . 2005. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res.* 19:276.

Burnol, A., A. Leturque, M. Loizeau, C. Postic, J. Girard. 1990. Glucose transporter expression in rat mammary gland. *Biochem. J.* 270:277-279.

Cardoso, O.O., F. C. Julião, R. I. Alves, A. R. Baena, I. G. Díez, M.N. Suzuki, B. S. Celere, M. Nadal, J.L. Domingo, S.I. Segura-Muñoz. 2014. Concentration Profiles of Metals in Breast Milk, Drinking Water, and Soil: Relationship Between Matrices. *Biol. Trace Elem. Res.* 160:116-122.



Cariño, M., L. Castorena, Y. Maya, J. Wurl, J. Urciaga, A. Breceda, A. 2012. Transformación de los ecosistemas áridos para su uso agrícola en Baja California Sur, México. Un análisis desde la historia ambiental. *Historia Agraria*. 56:82-102

Cavagnari, B.M. 2012. Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Arch Argent Pediatr*. 110:132-136.

Cayuela, L. 2010. Modelos lineales generalizados (GLM). Materiales de un curso de R del IREC. EcoLab, Centro Andaluz de Medio Ambiente, Universidad de Granada. pp 61-87.

Celis de la Rosa, A.D.J., V. Labrada-Martagon. 2014. Bioestadística. Editorial El Manual Moderno. Tercera edición. México, D.F. 337p.

Clarkson, T.W. 1995. Environmental contaminants in the food chain. *Am J Clin Nutr*. 61:682-686.

Clarkson, T.W., L. Magos, G.J. Myers. 2003. The toxicology of mercury current exposures and clinical manifestations. *N engl j med*. 2003:1731-1737.

Colborn, T., F.S. Vom Saal, A.M. Soto. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*. 101:378.

Concha, G., G. Vogler, B. Nermell, M. Vahter. 1998. Low-level arsenic excretion in breast milk of native Andean women exposed to high levels of arsenic in the drinking water. *Int. Arch. Occup. Environ*. 71:42-46.

Corredor, A., M. Landines. 2009. Efecto del ácido ascórbico sobre la respuesta de los peces ante condiciones de estrés. *Rev. Med. Vet. Zoot*. 56:53-66.

Cuypers, A., M. Plusquin, T. Remans, M. Jozefczak, E. Keunen, H. Gielen, K. Opdenakker, A.R. Nair, E. Munters, T.J. Artois. 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*. 23:927-940.

Czaja, K., J. Ludwicki, K. Góralczyk, P. Struciński. 1997. Effect of age and number of deliveries on mean concentration of organochlorine compounds in human breast milk in Poland. *Bull Environ Contam Toxicol*. 59:407-413.

Chao, H.H., C.H. Guo, C.B. Huang, P.C. Chen, H.C. Li, D.Y. Hsiung, Y. K. Chou. 2014. Arsenic, cadmium, lead, and aluminium concentrations in human milk at early stages of lactation. *Pediatr Neonatol*. 55:127-134.

Chao, H.R., S.L. Wang, T.C. Lin, X.H. Chung. 2006. Levels of organochlorine pesticides in human milk from central Taiwan. *Chemosphere*. 62:1774-1785.

Charles, M.J., M.J. Schell, E. Willman, H. Gross, Y. Lin, S. Sonnenberg, M. Graham. 2001. Organochlorines and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in cancerous and

noncancerous breast tissue: do the data support the hypothesis that oxidative DNA damage caused by organochlorines affects breast cancer? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 41:386-395.

Chávez-Almazán, L.A., J. Diaz-Ortiz, M. Alarcón-Romero, G. Dávila-Vazquez, H. Saldarriaga-Noreña, S.M. Waliszewski. 2014. Organochlorine Pesticide Levels in Breast Milk in Guerrero, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol.* 93:294-298.

Chen, C., L. Qu, B. Li, L. Xing, G. Jia, T. Wang, Y. Gao, P. Zhang, m. Li, W. Chen. 2005. Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations, and serum redox status in persons exposed to mercury. *Clin. Chem.* 51:759-767.

Cherkani-Hassani, A., I. Ghanname, N. Mouane. 2015. Assessment of Cadmium Level in Human Breast Milk and the Affecting Factors: A Systematic Review, 1971-2014. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57:2377-2391.

Chien, L.C., B.C. Han, C.S. Hsu, C.B. Jiang, H.J. You, M.J. Shieh, C.Y. Yeh. 2006. Analysis of the health risk of exposure to breast milk mercury in infants in Taiwan. *Chemosphere,* 64:79-85.

Dalle-Donne, I., D. Giustarini, R. Colombo, R. Rossi, A. Milzani. 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med.* 9:169-176.

de Figueiredo, C.S.M., D.B. Palhares, P. Melnikov, A.J.d.C.M.Moura, S.C. dos Santos. 2010. Zinc and copper concentrations in human preterm milk. *Biol Trace Elem Res.* 136:1-7.

Der Parsehian, S. 2008. Plaguicidas organoclorados en leche materna. *Rev. Hospital Materno Inf. Ramón Sardá,* 27:70-78.

Dey, S., A.S. Soliman, A. Hablas, I.A. Seifeldein, K. Ismail, M. Ramadan, H. El-Hamzawy, M.L.Wilson, M. Banerjee, P. Boffetta, J. Harford, S.D. Merajver. 2010. Urban-rural differences in breast cancer incidence in Egypt (1999-2006). *The Breast.* 19:417-423.

Díaz, B.F. 2004. Informe sobre metales y contaminantes orgánicos persistentes en niños y muestras ambientales de 10 sitios contaminados de México. Instituto Nacional de Ecología, Facultad de Medicina de la Universidad de San Luís Potosí, México.

Dodge, M.L., R.C. Wander, Y. Xia, J.A. Butler, P.D. Whanger. 1999. Glutathione peroxidase activity modulates fatty acid profiles of plasma and breast milk in Chinese women. *J Trace Elem Med Biol.* 12:221-230.

Relación de plaguicidas prohibidos para su importación, fabricación, formulación, comercialización y uso en México. *Diario Oficial de la Federación. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, 2000.*

Modificación a la norma oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación. Ciudad de México, 2000 .

Domellöf, M., K.G. Dewey, R.J. Cohen, B. Lönnerdal, O. Hernell. 2005. Iron supplements reduce erythrocyte copper-zinc superoxide dismutase activity in term, breastfed infants. *Act Paed.* 94:1578-1582.

Dorea, J. G. 2002. Selenium and breast-feeding. *Br J Nutr.* 88:443-461.

Dórea, J. G. 2012. Zinc and copper concentrations in breastmilk. *Indian Pediatr.* 49:592-592.

Dumache, R., M. Puiu, C. Canciu, N. Cucu. 2009. DNA methylation of *GSTP1*, a promising biomarker in early detection of prostate cancer. *Toxicol. Lett.* 189:161.

Ekinci, D., M. Cankaya, I. Gül, T.A. Coban. 2013. Susceptibility of cord blood antioxidant enzymes glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase to different antibiotics: in vitro approach. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 28:824-829.

Enríquez, M.G.M., L.F. Contreras, A.S.S. Rodríguez, J.A. Borunda. 2011. Mecanismos de reparación del ADN. En Salazar A.M., A.S. Sandoval, J. S. Armendáriz (eds.). *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. Editorial McGraw Hill Interamericana. Primera Edición. México, D.F. pp 82.

Ercal, N., H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns. 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:529-539.

Ermis, B., A. Yildirim, R. Örs, A. Tastekin, B. Ozkan, F. Akcay. 2005. Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and antioxidant potential levels in mothers at the postpartum seventh day. *Biol. Trace Elem. Res.* 105:27-36.

Faramarzi, M. 2012. The influences of vitamins C and E on the growth factors and carcass composition of common carp. *Glob. Vet.* 8:498-502.

Faridi, M., O. Singh, U. Rusia. 2006. Mother's iron status, breastmilk iron and lactoferrin—are they related? *Eur J Clin Nutr.* 60:903-908.

Farnham, I.M., A.K. Singh, K.J. Stetzenbach, K.H. Johannesson. 2002. Treatment of nondetects in multivariate analysis of groundwater geochemistry data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 60:265-281.

- Farooqui, T., A.A Farooqui. 2011. Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling. Editorial John Wiley & Sons. Primera edición. Hoboken , Nueva Jersey, E.U.A. 424 p.
- Ferrer, A. 2003. Intoxicación por metales Metal poisoning. *An Sist Sanit Navar.* 26:141-153
- Flohé, L., W.A. Günzler. 1984. Assays of glutathione peroxidase. En P. Lester (Ed.), *Methods in Enzymology*. Editorial Academic Press. Primera edición. Oxford, Inglaterra. 145p.
- Fraga, C.G., MK. Shigenaga, J.W. Park, P. Degan, B.N. Ames. 1990. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci.* 87: 4533-4537.
- Franco, M.C., C.N. Dennys, F.H. Rossi, A.G. Estévez. 2013. Superoxide Dismutase and Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis. En A.G. Estevez. *Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis*. InTech. [www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/superoxide-dismutase-and-oxidative-stress-in-amyotrophic-lateral-sclerosis](http://www.intechopen.com/books/current-advances-in-amyotrophic-lateral-sclerosis/superoxide-dismutase-and-oxidative-stress-in-amyotrophic-lateral-sclerosis)
- Friis, R. 2012. *Essentials of environmental health*. Editorial Jones & Bartlett Publishers. Segunda edición. Mississauga, Ontario, Canadá. 419 p.
- Fujii, Y., Y. Ito, K.H. Harada, T. Hitomi, A. Koizumi, K. Haraguchi. 2012. Comparative survey of levels of chlorinated cyclodiene pesticides in breast milk from some cities of China, Korea and Japan. *Chemosphere*, 89:452-457.
- Fujita, M., E. Roth, Y. J. Lo, C. Hurst, J. Vollner, A. Kendell. 2012. In poor families, mothers' milk is richer for daughters than sons: a test of Trivers–Willard hypothesis in agropastoral settlements in Northern Kenya. *Am. J. Phys. Anthropol.* 149:52-59.
- Gaetke, L.M., C.K. Chow. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicol.* 189:147-163.
- Galván-Portillo, M., C. Jiménez-Gutiérrez, L. Torres-Sánchez, L. López-Carrillo. 2002. Food consumption and adipose tissue DDT levels in Mexican women. *Cad Saude Publica* 18:447-452.
- García-Esquinas, E., B. Pérez-Gómez, M.A. Fernández, A.M. Pérez-Meixeira, E. Gil, C.D. Paz, A. Iriso, J.C. Sanz, J. Astray, M. Cisneros. 2011. Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and sociodemographic variables in Madrid (Spain). *Chemosphere*. 85:268-276.
- Gardner, S.C., M.D. Pier, R. Wesselman, J.A. Juárez. 2003. Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. *Mar Pollut Bull.* 46:1082-1089.

Gaxiola-Robles, R., V. Labrada-Martagon, A.D.C. de la Rosa, B. Acosta-Vargas, L.C. Mendez-Rodriguez, T. Zenteno-Savin. 2014. Interaction between mercury (Hg), arsenic (As) and selenium (Se) affects the activity of glutathione S-transferase in breast milk; possible relationship with fish and shellfish intake. *Nutr Hosp.* 30: 436-446.

Gaxiola-Robles, R., T. Zenteno-Savín, V. Labrada-Martagón, A.D.J. Celis de la Rosa, B. Acosta Vargas, L.C. Méndez-Rodríguez. 2013. Concentraciones de mercurio en leche de mujeres del noroeste de México: posible asociación a la dieta, tabaco y otros factores maternos. *Nutr Hosp.* 28:934-942.

Goldberg, D., R. Spooner. 1983. Glutathione reductase. *Methods of enzymatic analysis.* 3:258-265.

Griffith, O.W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106: 207-212.

Gumy-Pause, F., B. Pardo, M. Khoshbeen-Boudal, M. Ansari, A. Gayet-Ageron, A.P. Sappino, E.F. Attiyeh, H. Ozsahin. 2012. *GSTP1* hypermethylation is associated with reduced protein expression, aggressive disease and prognosis in neuroblastoma. *Genes Chromosom. Cancer.* 51:174-185.

Gundacker, C., B. Pietschnig, K.J. Wittmann, A. Lischka, H. Salzer, L. Hohenauer, E. Schuster. 2002. Lead and mercury in breast milk. *Pediatrics,* 110: 873-878.

Guo, J.Y., E.Y. Zeng, F.C. Wu, X. Z. Meng, B. X. Mai, X. Luo. 2007. Organochlorine pesticides in seafood products from southern China and health risk assessment. *Environ Toxicol Chem.* 26: 1109-1115.

Gürbay, A., M. Charehsaz, A. Eken, A. Sayal, G. Girgin, M. Yurdakök, S. Yiğit, D.D. Erol, G. Şahin, A. Aydın. 2012. Toxic metals in breast milk samples from Ankara, Turkey: assessment of lead, cadmium, nickel, and arsenic levels. *Biol Trace Elem Res.* 149:117-122.

Habig, W., W. Jakoby. 1980. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77:218-231.

Haluskova, J., L. Lachvac, V. Nagy. 2015. The investigation of *GSTP1*, *APC* and *G* gene promoter hypermethylation in urine DNA of prostate-diseased patients. *Bratisl Lek Listy.* 116:79-82.

Halliwell, B., J. Gutteridge. 2007. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press. Oxford, Reino Unido. Cuarta edición. 888p.

Hamre, K. 2011. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aquac Nutr.* 17:98-115.

- Hardell, E., M. Carlberg, M. Nordström, B. van Bavel. 2010. Time trends of persistent organic pollutants in Sweden during 1993–2007 and relation to age, gender, body mass index, breast-feeding and parity. *Sci. Total Environ.* 408:4412-4419.
- Hardy, G., I. Hardy. 2004. Selenium: The Se-XY nutraceutical. *Nutrition*, 20:590-593.
- Harms-Ringdahl, M., D. Jenssen, S. Haghdoost. 2012. Tomato juice intake suppressed serum concentration of 8-oxodG after extensive physical activity. *Nutr J.* 11:29.
- Hayakawa, H., A. Taketomi, K. Sakumi, M. Kuwano, M. Sekiguchi. 1995. Generation and elimination of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry*, 34:89-95.
- Hayes, J.D., D.J. Pulford. 1995. The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part II. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30:521-600.
- Helsel, D.R. 1990. Less than obvious-statistical treatment of data below the detection limit. *Environ. Sci. Technol.* 24: 1766-1774.
- Henderson, C.J., A.G. Smith, J. Ure, K. Brown, E.J. Bacon, C.R. Wolf. 1998. Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 5275-5280.
- Hensley, K., R.A. Floyd. 2003. *Methods in biological oxidative stress*. Humana Press Inc, Primera edición. Totowa, Nueva Jersey. 207p.
- Hermes-Lima, M., K. Storey. 1994. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase from an estivating land snail. *Z. Naturforsch. C Bio. Sci.* 50:685-694.
- Hermes-Lima, M., K.B. Storey. 1998. Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Mol. Cell. Biochem.* 189:79-89.
- Himmetoglu, S., Y. Dincer, E. Bozcali, V.A. Vural, T. Akcay. 2009. Oxidative DNA damage and antioxidant defense after reperfusion in acute myocardial infarction. *J Investig Med.* 57:595-599.
- Hossain, M.B., L. Barregard, G. Sallsten, K. Broberg. 2014. Cadmium, mercury, and lead in kidney cortex are not associated with urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) in living kidney donors. *Int Arch Occup Environ Health.* 87:315-322.
- Hussain, S., A. Atkinson, S. Thompson, A. Khan. (1999). Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice. *Journal of Environmental Science & Health Part B.* 34(4), 645-660.

- StatSoft, I.N.C. 2001. STATISTICA (data analysis software system), version 6. Tulsa, USA, 150p.
- Innis, S.M. 2007. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc.* 66:397-404.
- Iscan, M., T. Coban, I. Cok, D. Bulbul, B.C. Eke, S. Burgaz. 2002. The organochlorine pesticide residues and antioxidant enzyme activities in human breast tumors: is there any association? *Breast Cancer Res Treat.* 72:173-182.
- Jaga, K., C. Dharmani. 2003. Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. *Int J Occup Med Environ Health.* 16:7-20.
- Järup, L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68:167-182.
- Jiménez, M.R., G.R. Kuh. 2009. *Toxicología Fundamental*. Ediciones Díaz Santos. Cuarta edición. Sevilla, España. 565p.
- Jomova, K., Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C. Rhodes, M. Valko. 2011. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J. Appl. Toxicol.* 31:95-107.
- Jones, E., S. Spencer. 2007. The physiology of lactation. *Paediatr Int Child Health.* 17:244-248.
- Kaloyanova, F.P., M.A. El Batawi. 1991. *Human toxicology of pesticides*. CRC press. Primera edición. Boca Ratón, Florida, EUA. 189p.
- Karami-Mohajeri, S., M. Abdollahi. 2010. Toxic effects of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: A comprehensive review. *Hum Exp Toxicol.* 30:1119-1140.
- Kasperczyk, S., A. Kasperczyk, A. Ostafwska, M. Dziwisz, E. Birkner. 2004. Activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase, and lipid peroxidation in erythrocytes in workers exposed to lead. *Biol Trace Elem Res.* 102:61-72.
- Kennedy, C.H., H.I. Pass, J.B. Mitchell. 2003. Expression of human MutT homologue (hMTH1) protein in primary non-small-cell lung carcinomas and histologically normal surrounding tissue. *Free Radic. Biol. Med.* 34:1447-1457.
- Khaghani, S., H. Ezzatpanah, N. Mazhari, M.H. Givianrad, H. Mirmiranpour, F.S. Sadrabadi. 2010. Zinc and copper concentrations in human milk and infant formulas. *Iran. J. Pediatr.* 20:53-57.
- Kim, R.H., O.J. Kwon, J.W. Park. 2001. Ceruloplasmin enhances DNA damage induced by cysteine/iron in vitro. *Biochimie.* 83:487-495.

- Koner, B., B. Banerjee, A. Ray. 1998. Organochlorine pesticide-induced oxidative stress and immune suppression in rats. *Indian J Exp Biol.* 36:395-398.
- Konigsberg Fainstein, M., B. Aguilar-Maldonado. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Manual moderno. Primera edición. México, D.F. 636 p.
- Kono, Y., K. Nakamura, H. Kimura, N. Nishii, A. Watanabe, K. Banba, A. Miura, S. Nagase, S. Sakuragi, K.F. Kusano. 2006. Elevated levels of oxidative DNA damage in serum and myocardium of patients with heart failure. *Circ J.* 70:1001-1005.
- L'Abbé, M., K. Trick, A. Koshy. 1996. The selenium content of Canadian infant formulas and breast milk. *J Food Compos Anal.* 9:119-126.
- Labrada-Martagón, V., P.A. Tenorio Rodríguez, L.C. Méndez-Rodríguez, T. Zenteno-Savín. 2011. Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles *Chelonia mydas* inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 154:65-75.
- Levay, P.F., M. Viljoen. 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80:252-267.
- Levine, R.L., J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* (233):346-357.
- Li, C., X. Yang, M. Xu, J. Zhang, N. Sun. 2014. Association between *GSTP1* CpG methylation and the early phase of lead exposure. *Toxicol. Mech. Meth.* 24:111-115.
- Li, Y.F. 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. *Sci. Total Environ.* 232:121-158.
- Liang, X., Q. Su, H. Yang. 1999. Expression of *GST-π* and methylation of *GST-π* DNA in human gastric cancer. *Chin Clin Oncol.* 26:352-354.
- Lien, E.L. 2009. Toxicology and safety of DHA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 81:125-132.
- Lindmark-Månsson, H., B. Åkesson. 2000. Antioxidative factors in milk. *Br. J. Nutr.* 84:103-110.
- Lindsey, J.K. 1997. *Applying Generalized Linear Models.* Springer-Verlag New York, Incorporated. Primera edición. Itaca, NY, EUA. 258P.
- Linzell, J., M. Peaker. 1971. Mechanism of milk secretion. *Physiol. Rev.* 51:564-597.
- Lönnerdal, B. 2005. Trace element nutrition of infants. Molecular approaches. *J Trace Elem Med Biol.* 19:3-6.



- López de Romaña, D., D.C. Castillo, D. Diazgranados. 2010a. El zinc en la salud humana - I. *Rev Chil Nutr.* 37:234-239.
- López de Romaña, D., D.C. Castillo, D. Diazgranados. 2010b. El zinc en la salud humana - II. *Rev Chil Nutr.* 37:240-247.
- Lu, D., D. Wang, R. Ni, Y. Lin, C. Feng, Q. Xu, X. Jia, G. Wang, Z. Zhou. 2015. Organochlorine pesticides and their metabolites in human breast milk from Shanghai, China. *Environ Sci Pollut Res.* 22: 9293-9306.
- Mahdavi, R., L. Nikniaz, S.J. Gayemmagami. 2010. Association between zinc, copper, and iron concentrations in breast milk and growth of healthy infants in tabriz, Iran. *Biol. Trace Elem. Res.* 135:174-181.
- Mahmoud, R.H., M.J. Ewadh, K.J. Al-Hamadani. 2009. Clinical Assessment of glutathione peroxidase and catalase to the status of malondialdehyde in urolithiasis. *Pak J Med Sci,* 25:738-743.
- Markert, M., P.C. Andrews, B.M. Babior. 1984. Measurement of O<sub>2</sub>-production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. *Methods Enzymol.* 105:358.
- Marques, R.C., M.D.F.R. Moreira, J.V.E. Bernardi, J.G. Dórea. 2013. Breast Milk Lead Concentrations of Mothers Living Near Tin Smelters. *Bull Environ Contam Toxicol.* 91:549-554.
- McLaughlin, M.J., D. Parker, J. Clarke. 1999. Metals and micronutrients—food safety issues. *Field Crops Res.* 60:143-163.
- McManaman, J.L., M.C. Neville. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:629-641.
- Mehrdad, R., S. Aghdaei, G. Pouryaghoub. 2015. Urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in employees of subway system. *Acta Med Iran.* 53:287-292.
- Meier, B. 1991. Comparative studies on a superoxide dismutase exhibiting enzymatic activity with iron and manganese as active cofactor. *Free Radic Res.* 12:211-214.
- Mena, P., M. Milad. 1998. Variaciones en la composición nutricional de la leche materna. Algunos aspectos de importancia clínica. *Rev Chil Pediatr.* 69:116-121.
- Mesa-Cornejo, V.M., P. Barros-Núñez, C. Medina-Lozano. 2006. Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gac Med Mex.* 142:81-82.

- Mikołajewska, K., L. Kozłowska, O. Mizera, M.B. Król, R. Brodzka, W. Wąsowicz, J. Gromadzinska. 2016. Oxidative DNA damage in healthy Polish population. *Toxicol. Lett.* 258:83.
- Monks, J., M. Neville. 2000. Transcytosis of proteins across the mammary epithelium into milk. *J Women's Cancer.* 2:193-200.
- Moreno Casasola, P. 2008. Los humedales en México: tendencias y oportunidades. *Cuadernos de Biodiversidad* . pp10-18.
- Morera Pons, S., A. Castellote Bargalló, C. Campoy Folgoso, M.C. López Sabater. 2000. Triacylglycerol composition in colostrum, transitional and mature human milk. *Eur J Clin Nutr.*54:878-882.
- Nag, S., M. Raikwar. 2011. Persistent organochlorine pesticide residues in animal feed. *Environ Monit Assess.* 174:327-335.
- Nair, A., R. Mandapati, P. Dureja, M. Pillai. 1996. DDT and HCH load in mothers and their infants in Delhi, India. *Bull Environ Contam Toxicol.* 56:58-64.
- Nakabeppu, Y., K. Sakumi, K. Sakamoto, D. Tsuchimoto, T. Tsuzuki, Y. Nakatsu. 2006. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol. Chem.* 387:373-379.
- Naz, R.K. 2004. Endocrine disruptors: effects on male and female reproductive systems. CRC Press. Segunda edición. Boca Ratón, Florida. 464 p.
- Newman, M.C. 2009. Fundamentals of ecotoxicology. CRC press. Tercera edición. Boca Ratón, Florida. 571 p.
- Niño-Torres, C.A., S.C. Gardner, T. Zenteno-Savín, G.M. Ylitalo. 2009. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in California sea lions *Zalophus californianus californianus* from the Gulf of California, México. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56:350-359.
- Norii, T. 2005. Relationship between zinc parameters and either body weight gain, protein intake or survival time in zinc-deficient rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 51:433-439.
- Ordway, J.M., T. Curran. 2002. Methylation matters: modeling a manageable genome. *Cell Growth Differ.* 13:149-162.
- Örün, E., S.S. Yalçın, O. Aykut, G. Orhan, G.K. Morgil. 2012. Zinc and copper concentrations in breastmilk at the second month of lactation. *Indian Pediatr.* 49:133-135.

- Özdemir, H.S., F. Karadas, A.C. Pappas, P. Cassey, G. Oto, O. Tuncer. 2008. The Selenium Levels of Mothers and Their Neonates Using Hair, Breast Milk, Meconium, and Maternal and Umbilical Cord Blood in Van Basin. *Biol Trace Elem Res.* 122: 206-215.
- Palma, A.V. 1998. Cancer de próstata, biología molecular, herencia y prevención. *Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.* 27:97-99.
- Parke, D., C. Ioannides, D. Lewis. 1991. The role of the cytochromes P450 in the detoxication and activation of drugs and other chemicals. *Can J Physiol Pharmacol.* 69:537-549.
- Parl, F.F. 2005. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer Lett.* 221:123-129.
- Parr, R.M., E.M. DeMaeyer, V.G. Iyengar, A.R. Byrne, G.F. Kirkbright, G. Schöch, L. Niinistö, O. Pineda, H.L. Vis, Y. Hofvander. 1991. Minor and trace elements in human milk from Guatemala, Hungary, Nigeria, Philippines, Sweden, and Zaire. *Biol Trace Elem Res.* 29:51-75.
- Pazou, E.Y.A., J.P. Azehoun, T. Ahoyo, P.E. Aléodjrodo, N.M. van Straalen, C.A.M. van Gestel. 2013. Influence of Fishing Technique on Organochlorine Pesticide Accumulation in Fish and its Possible Human Health Risk in the Republic of Bénin. *Bull Environ Contam Toxicol.* 91:278-282.
- Perottoni, J., O.E.D. Rodrigues, M.W. Paixão, G. Zeni, L.P. Lobato, A.L. Braga, J.B.T. Rocha, T. Emanuelli. 2004. Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol.* 42:17-28.
- Persky, A.M., P.S. Green, L. Stublely, C.O. Howell, L. Zaulyanov, G.A. Brazeau, J.W. Simpkins. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223:59-66.
- Pham-Huy, L.A., H. He, C. Pham-Huy. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci.* 4:89-96.
- Picciano, M.F. 2001. Nutrient composition of human milk. *Pediatr Clin North Am.* 48:53-67.
- Pinheiro, J., D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar. 2013. The R Development Core Team. NLME: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-105. The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Pizent, A., J. Jurasović, S. Telišman. 2003. Serum calcium, zinc, and copper in relation to biomarkers of lead and cadmium in men. *J Trace Elem Med Biol.* 17:199-205.

- Pohl, H.R., C.A. Tylenda. 2000. Breast-feeding exposure of infants to selected pesticides: a public health viewpoint. *Toxicol. Ind. Health.* 16:65-77.
- Polyakov, L.M., M.I. Chasovskikh, L.E. Panin. 1996. Binding and transport of benzo [a] pyrene by blood plasma lipoproteins: the possible role of apolipoprotein B in this process. *Bioconjug. Chem.* 7:396-400.
- Prado, G., G. Díaz, M. Noa. 2004. Niveles de pesticidas organoclorados en leche humana de la Ciudad de México. *Agro sur*, 32:60-69.
- Prospéro-García, O., M. Méndez Díaz, I. Alvarado Capuleño, M. Pérez Morales, J. López Juárez, A.E. Ruiz Contreras. 2013. Inteligencia para la alimentación: alimentación para la inteligencia. *Salud Ment.* 36:109-113.
- Ramírez, J., M.Lacasaña. 2001. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor.* 4:67-75.
- Ramírez, M.A.Y., A.G. García, J. Barrera. 2003. El Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y sus implicaciones para México. *Gaceta Ecológica* 69:7-28.
- Rangan, U., G. Bulkley. 1993. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *Br. Med. Bull.* 49:700-718.
- Rani, V., U.C.S. Yadav. 2014. *Free Radicals in Human Health and Disease*. Springer. Primera edición. Uttar, Pradesh, India. 257p.
- Requena, J., R. Levine, E. Stadtman. 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids.* 25:221-226.
- Reyes-Montiel, N.J., A. Santamaría-Miranda, G.D. Rodríguez-Meza, J.G. Galindo-Reyes, H.A. González-Ocampo. 2013. Concentrations of Organochlorine Pesticides in Fish *Mugil Cephalus* from a Coastal Ecosystem in the Southwestern Gulf of California. *Proc R Ir Acad.* 113: 281-291
- Ríos-Romero, M., A.G. Soto-Valladares, P. Piña-Sánchez. 2015. Alteraciones epigenéticas en la progresión del cáncer cervicouterino. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 53:212-217.
- Rivera-Rodríguez, L.B., R. Rodríguez-Estrella. 2011. Incidence of organochlorine pesticides and the health condition of nestling ospreys (*Pandion haliaetus*) at Laguna San Ignacio, a pristine area of Baja California Sur, Mexico. *Ecotoxicology.* 20:29-38.
- Rivera-Rodríguez, L.B., R. Rodríguez-Estrella, J.J. Ellington, J.J. Evans. 2007. Quantification of low levels of organochlorine pesticides using small volumes ( $\leq 100\mu\text{l}$ ) of plasma of wild birds through gas chromatography negative chemical ionization mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 148:654-662.

- Rodas-Ortíz, J.P., V. Ceja-Moreno, R. González-Navarrete, J. Alvarado-Mejía, M.E. Rodríguez-Hernández, G. Gold-Bouchot. 2008. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls levels in human milk from Chelem, Yucatán, México. *Bull Environ Contam Toxicol.* 80:255-259.
- Rodríguez, B.E.S. 2009. La contaminación ambiental y sus consecuencias Toxicológicas. Editorial Lulu. Primera edición. España. 132p.
- Rodriguez, L.C.M., S.T. Alvarez-Castañeda. 2014. Influence of trace elements in the epigenetic of mammals. *Therya.* 5:817-829.
- Rosado, J.L. 1998. Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública, México.* 40:181-188.
- Sahoo, A., L. Samanta, G. Chainy. 2000. Mediation of oxidative stress in HCH-induced neurotoxicity in rat. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39:7-12.
- Shen, H., K.M. Main, A.M. Andersson, I.N. Damgaard, H.E. Virtanen, N.E. Skakkebaek, J. Toppari, K.W. Schramm. 2008. Concentrations of persistent organochlorine compounds in human milk and placenta are higher in Denmark than in Finland. *Hum Reprod.* 23:201-210.
- Shennan, D., M. Peaker. 2000. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol. Rev.* 80:925-951.
- Shinozaki, M., D.S. Hoon, A.E. Giuliano, N.M. Hansen, H.J. Wang, R. Turner, B. Taback. 2005. Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res.* 11:2156-2162.
- Sierra-Santoyo, A., M. Hernandez, A. Albores, M. Cebrian. 2000. Sex-dependent regulation of hepatic cytochrome P-450 by DDT. *Toxicol Sci.* 54:81-87.
- Sies, H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82:291-295.
- Smith, G.M., E.N. Ieno, A.A. Saveliev, N. Walker, A.F. Zuur. 2009. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R (Vol. 1. Aufl.).* Springer-Verlag. Primera edición. Newburgh, United Kingdom . 563p.
- Smith, T.J., A. Liao, L.D. Wang, G. Yang, S. Starcic, M.A. Philbert, C.S. Yang. 1998. Characterization of xenobiotic-metabolizing enzymes and nitrosamine metabolism in the human esophagus. *Carcinogenesis.* 19:667-672.
- Solvio, M.J., T.J. Joy, L. Sallans, E.J. Merino. 2010. Copper generated reactive oxygen leads to formation of lysine–DNA adducts. *J. Inorg. Biochem.* 104:1000-1005.
- Sonawane, B.R. 1995. Chemical contaminants in human milk: an overview. *Environ Health Perspect.* 103:197.

- Sowmya, R., N.M. Sachindra. 2012. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system. *Food Chem.* 134:308-314.
- Sternowsky, H.J., B. Moser, D. Szadkowsky. 2002. Arsenic in breast milk during the first 3 months of lactation. *Int J Hyg Environ Health.* 205:405-409.
- Stohs, S.J., D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med.* 18:321-336.
- Strachan, S. 2010. Trace elements. *Curr Anaesth Crit Care.* 21:44-48.
- Su, L., H.L Wang, M. Wang, S.T. Yin, L. Chen, L.G. Sun, D.Y. Ruan. 2008. The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf.* 70:483-489.
- Sullivan, J.B., G.R. Krieger. 2001. Clinical environmental health and toxic exposures. Lippincott Williams & Wilkins. Primera edición. Philadelphia, Pennsylvania. 1295p.
- Suzuki, K. 2000. Measurement of Mn-SOD and Cu, Zn-SOD. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species.* Oxford University Press. Primera edición. Oxford, New York. 333p.
- Tabachnick, B.G., L.S. Fidell. 2001. Using multivariate statistics. Allyn and Bacon. Cuarta edición. Boston, MA. 966p.
- Tijerina-Sáenz, A., S. Innis, D. Kitts. 2009. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. *Acta Paediatr.* 98:1793-1798.
- Townsend, D.M., K.D. Tew. 2003. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene,* 22:7369.
- Valdés, V., A. Pérez. 1994. Habbok M. Fisiología de la glándula mamaria. En Valdés, V., A. Pérez (eds.). *Lactancia para la Madre y el Niño.* Editorial Santiago Mediterráneo. Primera Edición. Providencia, Región Metropolitana, Chile ; pp21.
- Vázquez-Medina, J.P., T. Zenteno-Savín, R. Elsner. 2006. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Comp Biochem Physiol C.* 142:198-204.
- Vélez-Alavez, M., V. Labrada-Martagón, L.C. Méndez-Rodríguez, F. Galván-Magaña, T. Zenteno-Savín. 2013. Oxidative stress indicators and trace element concentrations in tissues of mako shark *Isurus oxyrinchus*. *Comp Biochem Physiol A.* 165:508-514.
- Villa Rodríguez, A.O., Á. Bracamonte Sierra. 2013. Procesos de aprendizaje y modernización productiva en el agro del noroeste de México: Los casos de la agricultura

comercial de la Costa de Hermosillo, Sonora y la agricultura orgánica de la zona sur de Baja California Sur. *Estudios fronterizos*. 14: 217-254.

Vulimiri, S.V., X. Wu, W. Baer-Dubowska, M.D. Andrade, M. Detry, M.R. Spitz, J. DiGiovanni. 2000. Analysis of aromatic DNA adducts and 7,8-dihydro-8-oxo- 2'-deoxyguanosine in lymphocyte DNA from a case-control study of lung cancer involving minority populations. *Mol. Carcinog.* 27:34-46.

Vuori, E., S. Mäkinen, R. Kara, P. Kuitunen. 1980. The effects of the dietary intakes of copper, iron, manganese, and zinc on the trace element content of human milk. *Am J Clin Nutr.* 33:227-231.

Waliszewski, S., A. Aguirre, R. Infanzon, A. Benitez, J. Rivera, J. 1999. Comparison of organochlorine pesticide levels in adipose tissue and human milk of mothers living in Veracruz, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol.* 62:685-690.

Waliszewski, S., A. Aguirre, R. Infanzon, C. Silva, J. Siliceo. 2001. Organochlorine pesticide levels in maternal adipose tissue, maternal blood serum, umbilical blood serum, and milk from inhabitants of Veracruz, Mexico. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40:432-438.

World Health Organization. 1984. International program on chemical safety.

World Health Organization. 1995. Environmental Health Criteria (Vol. 165).

World Health Organization. 2001. Report of the expert consultation of the optimal duration of exclusive breastfeeding, Geneva, Switzerland, 28-30 March 2001.

Widschwendter, M., P.A. Jones. 2002. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene*, 21:5462-5482.

Winiarska-Mieczan, A. 2014. Cadmium, lead, copper and zinc in breast milk in Poland. *Biol Trace Elem Res.* 157:36-44.

Wu, T., E. Giovannucci, J. Welge, P. Mallick, G. LeMasters, W. Tang, S.M. Ho. 2010. Measurement of *GST-P1* methylation in body fluids and prostate cancer diagnosis: a meta-analysis. *Br J Cancer.* 105:65-73

Wu, Y., X. Zhang, F. Bardag-Gorce, R.C.V. Robel, J. Aguilo, L. Chen, Y. Zeng, K. Hwang, S.W. French, S.C. Lu, Y.J. Y. Wan. 2004. Retinoid X Receptor  $\alpha$  Regulates Glutathione Homeostasis and Xenobiotic Detoxification Processes in Mouse Liver. *Mol. Pharmacol.* 65:550-557.

Xavier, R., K. Rekha, K. Bairy. 2004. Health perspective of pesticide exposure and dietary management. *Mal J Nutr*, 10:39-51.

- Xiang, F., X. Shuanglun, W. Jingfeng, N. Ruqiong, Z. Yuan, L. Yongqing, Z. Jun. 2011. Association of serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels with the presence and severity of coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 22:223-227.
- Xu, L.H., J. Xu, L.J. Lian, C. Wu, X.F. Wang, W.Y. Fu. 2008. Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food Chem Toxicol.* 46:1488-1494.
- Xu, X., A.B. Dailey, E.O. Talbott, V.A. Ilacqua, G. Kearney, N.R. Asal. 2010. Associations of serum concentrations of organochlorine pesticides with breast cancer and prostate cancer in US adults. *Environ Health Perspect.* 118:60.
- Yelinova, V., Y. Glazachev, V. Khramtsov, L. Kudryashova, V. Rykova, R. Salganik. 1996. Studies of Human and Rat Blood under Oxidative Stress: Changes in Plasma Thiol Level, Antioxidant Enzyme Activity, Protein Carbonyl Content, and Fluidity of Erythrocyte Membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221:300-303.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall. Tercera edición., Upper Saddle River, New Jersey. 299p.
- Zhang, X., B. Shi, J.E. Spallholz. 1993. The selenium content of selected meats, seafoods, and vegetables from Lubbock, Texas. *Biol Trace Elem Res.* 39:161-169.
- Zhou, J., X. Zeng, K. Zheng, X. Zhu, L. Ma, Q. Xu, X. Zhang, Y. Yu, G. Sheng, J. Fu. 2012. Musks and organochlorine pesticides in breast milk from Shanghai, China: Levels, temporal trends and exposure assessment. *Ecotoxicol Environ Saf.* 84:325-333.
- Ziech, D., R. Franco, A.G. Georgakilas, S. Georgakila, V. Malamou-Mitsi, O. Schoneveld, A. Pappa, M.I. Panayiotidis. 2010. The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem. Biol. Interact* 188:334-339.
- Zúñiga-Violante, E., L.W. Daessle, M.L. Camarena-Ojinaga, E.A.G. Galindo, M.E.A. Garcia. 2015. Distribución de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el valle agrícola de Maneadero, Baja California, México. *Investigación ambiental Ciencia y política pública*, 7(1).



## 11. ANEXOS

### Anexo A. Consentimiento informado



#### Carta de Consentimiento Informado

##### 1. Nombre del estudio y Patrocinador

**“Respuesta antioxidante de la leche materna a la presencia de contaminación química”**

**Clave SALUD 2010-C01-140272**

El estudio se llevará a cabo en la Cd. de La Paz Baja California Sur por Investigadores de la Unidad de Estrés Oxidativo del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

##### 2. Propósito del estudio

Lo(a) estamos invitando a participar en un estudio de investigación que se lleva a cabo con el propósito determinar la presencia de algunos genes presentes en el ADN de mujeres sudcalifornianas, que protegen contra la contaminación química, previniendo futuras enfermedades. Si se pregunta que es un contaminante químico, bueno, pues son aquellos compuestos que en su mayoría se encuentran presentes en el medio ambiente por el desarrollo

tecnológico. Estos pueden ser insecticidas como el DDT y todos sus compuestos y algunos metales como el plomo, el mercurio, el cadmio entre otros. Usted ha sido invitada a participar en este estudio porque es originaria de Baja California Sur, por lo que pensamos que pudiera ser un buen candidato para participar en este proyecto. Estudiaremos el ADN contenido en muestras de sangre de madres sudcalifornianas y con residencia en el estado de Baja California Sur, que hayan tenido a sus hijos en la Cd de la Paz. La muestra será tomada por una enfermera certificada. Al igual que usted, 108 mujeres más serán invitadas a participar. Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

### **3. Procedimientos**

a) Si usted acepta participar ocurrirá lo siguiente:

- Se tomarán dos muestras de sangre de 5 ml cada una las cuales se tomarán de por punción venosa, serán contenidas en tubos Vacutainer© sin anticoagulante para la recuperación de suero, y con EDTA como anticoagulante para recuperar plasma y eritrocitos.
- Se le harán algunas preguntas sobre su alimentación, del ambiente en el hogar y laboral
- El tiempo que esto tomará no será de más de 20 minutos.

### **4. Posibles riesgos y molestias.**

La toma de la muestra sanguínea podría ocasionarle dolor, el mismo que usted percibe en cualquier toma por punción sanguínea.

### **5. Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.**

No recibirá un pago por su participación en este estudio, ni implica gasto alguno para usted.

No recibirá ningún beneficio al participar en este estudio.

Un posible beneficio de su participación en este estudio es que los resultados de las pruebas de laboratorio que le realizaremos le proporcionarán información sobre su estado de salud.

El saber que su estado de salud es bueno pudiera ser un beneficio para usted.

Si bien los beneficios directos para usted pudieran no existir, los resultados del presente estudio contribuirán al avance en el conocimiento de la cadena causal de los riesgos para la salud que los contaminantes abióticos en especial metales pesados e insecticidas representan para la salud de las madres y los niños sudcalifornianos. Además, los resultados de este estudio brindarán información relevante para el mejor manejo de personas como usted lo que brindará información de gran utilidad para futuros programas de prevención primaria y secundaria del binomio madre hijo.

#### **6. Participación o retiro.**

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento. El abandonar el estudio en momento que quiera no modificará de ninguna manera el que nosotros le brindemos los resultados hasta el momento recabados.

Su participación implica responder a una entrevista. De tal forma que se le pedirá que responda sobre datos personales. Las entrevistas se llevan a cabo en forma individual y confidencial. Esta información será totalmente confidencial, esto es será conservada de forma tal que usted no pueda ser identificado(a). Pudiera ser que dentro de las preguntas en el cuestionario o durante la entrevista, alguna de estas preguntas le hiciera sentir incómodo(a), pero usted tiene todo el derecho de no responder a cualquiera pregunta que le incomode. Usted puede hacer las preguntas que desee al inicio o a lo largo del estudio a las personas encargadas del estudio.

#### **7. Privacidad y confidencialidad.**

La información que se obtenga como parte de este estudio es estrictamente confidencial. La información que nos proporcione que pudiera ser utilizada para identificarla/o, (su nombre, teléfono y dirección) será guardada de manera confidencial. Sus datos personales serán

guardados por separado para mantener la confidencialidad de sus respuestas a los cuestionarios y de los resultados de sus pruebas clínicas. Sus datos personales, sus cuestionarios, y sus resultados serán guardados en un archivero bajo llave en las oficinas del laboratorio de estrés oxidativo en CIBNOR. Sólo el equipo de investigación tendrá acceso a su información.

El equipo de investigadores y el médico que le realice el examen clínico, sabrán que usted está participando en este estudio. Sin embargo, nadie más tendrá acceso a la información sobre usted, o que usted nos proporcione durante su participación en este estudio, al menos de que usted así lo desee. Sólo proporcionaremos su información si fuera necesario para proteger sus derechos o bienestar (por ejemplo, si llegara a sufrir algún daño físico o si llegara a necesitar cuidados de emergencia): o si lo requiere la ley.

Cuando los resultados de este estudio sean publicados o presentados en conferencias, no se dará información que pudiera revelar su identidad. Su identidad será protegida y ocultada. Para proteger su identidad, su nombre y toda información que pudiera ser utilizada para identificarla/o no estará vinculada con la información que nos proporcione en la entrevista y con los resultados de sus estudios de gabinete y laboratorio. Le asignaremos un número que utilizaremos para identificar sus datos, y usaremos ese número en lugar de su nombre en nuestras bases de datos. Guardaremos toda su información en bases de datos seguras que estarán protegidas por una clave de acceso. Toda la información será destruida 5 años después de concluir el estudio.

#### **8. Personal de contacto para dudas y aclaraciones**

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 8:00 a 20:00 horas, de lunes a viernes con el Dr. Ramón Gaxiola Robles, que es el investigador responsable del área médica, a al teléfono: 612 3485229 o en la Unidad de Investigación de Estrés Oxidativo en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Km. 1 Carretera a San Juan de La Costa "EL COMITAN" Apdo. Postal 128 La Paz, BCS 23097, México

**Declaración de consentimiento informado**

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

No autorizo

Sí autorizo participar en el estudio y que se me tomen las muestras de sangre que se emplearan en el laboratorio para los estudios pertinentes.

---

Nombre del Participante

---

Firma del Participante

Fecha

**Firma del encargado de obtener el consentimiento informado**

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que el/ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

---

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

---

Firma del Investigador

Fecha

**Firma de los testigos**

Mi firma como testigo certifica que la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

---

Nombre del Testigo 1.

---

Firma del Testigo

Fecha

---

Nombre del Testigo 2.

---

Firma del Testigo

Fecha

### Anexo B. Cuestionario aplicado a las mujeres lactantes

<b>FICHA DE IDENTIFICACIÓN</b>		
Nombre		
Fecha de nacimiento		
Lugar de nacimiento		
Edad		
Peso		
Talla		
Domicilio		
Calle		
Municipio		
Estado		
Preguntas:	Si	No
1.- ¿En los últimos 5 años ha viajado o residido en otro lugar al que ocupa ahora?		
2.- ¿En dónde, municipio y estado?		
3.- ¿Ha estado embarazada antes?		
4.- ¿Cuántas veces ha estado embarazada (incluyendo esta vez)? 1, 2, 3, 4, 5 o más		
5.- Fecha de parto, cesárea o aborto ANTERIOR A ESTE:		
6.- ¿Cuántos hijos vivos?		
8.- ¿Ha cuantos hijos has amamantado? 1, 2, 3, 4 o más		
9.- Si lo hizo, ¿por cuánto tiempo?		
10.- ¿Está en alguna dieta especial?		
Cual:		
11.- ¿Hay algunos alimentos que limita, evita o no come?		
Cuáles:		
12.- ¿Es usted vegetariana?		
13.- Con qué frecuencia come usted pescado: Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la semana, varias veces a la semana		
14.- Con qué frecuencia come usted mariscos: Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la semana, varias veces a la semana		
Preguntas:	Si	No
15.- Con qué frecuencia come usted leche o queso: Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la semana, varias veces a la semana		
16.- ¿Consume algunos de estos productos?		
Vitaminas prenatales		

Otras vitaminas/minerales		
Hierbas		
Pastillas con hierro		
Aceite de pescado, omega 3		
Laxantes		
Medicamentos sin prescripción médica (Aspirina, tylenol, etc.)		
Ninguno		
Otros		
Remedios caseros		
17.- ¿Cuáles de estas condiciones tiene?		
Alta presión		
Anemia		
Diabetes		
Acidez		
Enfermedades renales		
Estreñimiento		
Ninguna		
Otra		
18.- ¿Fuma o alguien en la casa fuma?		
19.- ¿Dónde trabaja? casa		
Oficina		
Agrícola		
Comercio		
Industria		
Taller (coches, pintura, eléctrico)		



### Anexo C. Cuestionario aplicado en la toma de muestras de sangre

<b>FICHA DE IDENTIFICACIÓN</b>	
Nombre	
Fecha de nacimiento	
Lugar de nacimiento	
Edad	
Peso	
Talla	
Domicilio	
Calle	
Municipio	
Estado	
<b>Preguntas:</b>	
<b>1. ¿Con qué frecuencia come usted pescado?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.
<b>2. ¿Qué tipo de pescado consume?</b>	
<b>3. Con qué frecuencia come usted mariscos:</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.
<b>4. ¿Qué tipo de marisco consume?</b>	
<b>5. ¿Con qué frecuencia come usted carne de puerco?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.
<b>6. ¿Con qué frecuencia come usted pollo?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.
<b>7. ¿Con qué frecuencia come usted carne de res?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana.
<b>8. ¿Con qué frecuencia come usted arroz?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana, una vez al día, varias veces al día.
<b>9. ¿Con qué frecuencia come usted tortillas de maíz?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana, una vez al día, varias veces al día. ¿Cuántas tortillas? _____

<b>10. ¿Con qué frecuencia come usted frijol?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana, una vez al día, varias veces al día.		
<b>11. ¿Con qué frecuencia come usted leche o queso?</b>	Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana, una vez al día, varias veces al día.		
<b>12. ¿Usted fuma?, ¿o alguien en la casa fuma?</b>	Si o No Si o No		
<b>13. ¿Dónde trabaja o a que se dedica?</b>	Hogar, campesino, empleado, obrero, comerciante, estudiante, pensionado, profesionista, jornalero		
<b>14. ¿Cuántas piezas dentales tiene con amalgamas?</b>			
<b>15. ¿Sufre usted de algún tipo de enfermedad?</b>	Si o No ¿Cuál? _____		
<b>16. ¿Toma usted algún medicamento?</b>	Si o No ¿Cuál? _____		
<b>17. ¿Utiliza algún insecticida en casa?</b>	Si o No ¿Con que frecuencia? Nunca, 1 vez al mes, una vez cada 15 días, 1 vez a la semana, varias veces a la semana, una vez al día, varias veces al día		
<b>18. Antecedentes patológicos</b>			
Padecimiento	Tiempo de evolución	Tratamiento	Fecha y resultado de la última prueba
Cardiovasculares			
Diabetes			
Respiratorios			
Digestivas			
Renales			
Hematopoyéticas			

Colágena			
Infecciosas			
Cáncer			
Otras _____			

Fecha:

Nombre del encuestador:

Número de folio:

**Anexo D. Niveles de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina en sangre de mujeres de Baja California Sur (n= 34).**

	Mediana	Rango	Percentil 25%	Percentil 75%
8-oxo-dG (ng mL <sup>-1</sup> )	1.27	0.18 – 27.22	0.66	2.52
8-oxo-dG (ng mL <sup>-1</sup> ) / ADN (μg μL <sup>-1</sup> )	18.25	2.69- 97.20	11.93	47.97
8-oxo-dG (nM)	5.75	0.85 – 49.08	2.39	9.92
8-oxo-dG (nM) / ADN (μg μL <sup>-1</sup> )	64.26	9.44 – 432.43	39.12	173.22