

ISSN 2410-3551

Volumen 2, Número 4 – Julio – Septiembre -2015

Revista de Ciencias de la Salud

ECORFAN®

Indización



ECORFAN- Bolivia

- Google Scholar
- Research Gate
- REBID
- Mendeley
- RENIECYT

ECORFAN-Bolivia

Directorio

Principal

RAMOS-ESCAMILLA, María. PhD

Director Regional

IGLESIAS-SUAREZ, Fernando. BsC

Director de la Revista

PERALTA-CASTRO, Enrique. MsC

Edición de Logística

CLAUDIO-MENDEZ, Paul. BsC

Diseñador de Edición

LEYVA-CASTRO, Iván. BsC

Revista de Ciencias de la Salud, Volumen 2, Número 4, de Julio a Septiembre 2015, es una revista editada trimestralmente por ECORFAN-Bolivia. Loa 1179, Cd. Sucre. Chuquisaca, Bolivia. WEB: www.ecorfan.org, revista@ecorfan.org. Editora en Jefe: RAMOS-ESCAMILLA, María ISSN-2410-3551. Responsables de la última actualización de este número de la Unidad de Informática ECORFAN. ESCAMILLA-COUCHAN, Imelda, LUNA-SOTO, Vladimir, actualizado al 30 de Septiembre 2015.

Las opiniones expresadas por los autores no reflejan necesariamente las opiniones del editor de la publicación.

Queda terminantemente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin permiso del Instituto Nacional del Derecho de Autor.

Consejo Editorial

TAVERA-CORTÉS, María Elena. PhD
Instituto Politécnico Nacional, México

MONTERO-PANTOJA, Carlos. PhD
Universidad de Valladolid, España

BLANCO-ENCOMIENDA, Francisco. PhD
Universidad de Granada, España

SÁNCHEZ-TRUJILLO, Magda Gabriela. PhD
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México

AZOR-HERNÁNDEZ, Ileana. PhD
Universidad de las Américas Puebla, México

ALIAGA-LORDEMANN, Francisco Javier. PhD
Universidad de Zaragoza, España

GARCÍA-BARRAGÁN, Luis Felipe. PhD
Universidad de Guanajuato, México

ARANCIBIA-VALVERDE, María Elena. PhD
Universidad Pedagógica Enrique José Varona de la Habana, Cuba

Consejo Arbitral

PSA. PhD

Universidad Autónoma Chapingo, México

VDO. PhD

Universidad Centroamericana, Nicaragua

TGJC. PhD

Instituto Politécnico Nacional, México

ABD. PhD

Instituto Politécnico Nacional, México

GIMR. PhD

Universidad Nacional Autónoma de México, México

MBOM. PhD

Universidad Nacional Autónoma de México, México

SAOH. PhD

Universidad Nacional Autónoma de México, México

CHBM. PhD

Universidad Autónoma Metropolitana, México

Presentación

ECORFAN, es una revista de investigación que publica artículos en las áreas de: Ciencias de la Salud.

En Pro de la Investigación, Docencia, y Formación de los recursos humanos comprometidos con la Ciencia. El contenido de los artículos y opiniones que aparecen en cada número son de los autores y no necesariamente la opinión de la Editora en Jefe.

En el primer número es presentado el artículo *Daño genotóxico en mujeres de la población de Taxco de Alarcón Guerrero* por SALAS, Vanessa, LÓPEZ, Jenny, VÁZQUEZ, Analinne, TALAVERA-MENDOZA, Oscar, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena, como siguiente artículo está *El polimorfismo Q192R de la Paraoxonasa 1 como modulador del efecto oxidativo del plaguicida Metamidofos en células mononucleares de sangre periférica* por RAMÍREZ-VARGAS, Marco Antonio, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo, FLORES-ALFARO, Eugenia, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena, como tercer capítulo está *La exposición a Metamidofos altera la expresión de p53 en células MCF-10^a* por SERAFIN, Jesus, OLEA, Monserrat, ANTONIO-VEJAR, Veronica, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena, como cuarto capítulo *Prevalencia de trichomonas vaginales en mujeres embarazadas que asisten al laboratorio del Hospital San Roque Villazón* por LEZ-VILLAFUERTE, Alvino, MAMANI, Marice con adscripción en la Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Contenido

Artículo	Pág.
Daño genotóxico en mujeres de la población de Taxco de Alarcón Guerrero SALAS, Vanessa, LÓPEZ, Jenny, VÁZQUEZ, Analinne, TALAVERA-MENDOZA, Oscar, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena	87-91
El polimorfismo Q192R de la Paraoxonasa 1 como modulador del efecto oxidativo del plaguicida Metamidofos en células mononucleares de sangre periférica RAMÍREZ-VARGAS, Marco Antonio, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo, FLORES- ALFARO, Eugenia, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena	92-98
La exposición a Metamidofos altera la expresión de p53 en células MCF-10 ^a SERAFIN, Jesus, OLEA, Monserrat, ANTONIO-VEJAR, Veronica, MORENO- GODINEZ, Ma. Elena	99-104
Prevalencia de trichomonas vaginales en mujeres embarazadas que asisten al laboratorio del Hospital San Roque Villazón LEZ-VILLAFUERTE, Alvino, MAMANI, Marice	105-108

Instrucciones para Autores

Formato de Originalidad

Formato de Autorización

Daño genotóxico en mujeres de la población de Taxco de Alarcón Guerrero

SALAS, Vanessa*†, LÓPEZ, Jenny, VÁZQUEZ, Analinne, TALAVERA-MENDOZA, Oscar, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena

Recibido 05 Enero, 2015; Aceptado 31 Julio, 2015

Resumen

La industria minera representa una fuente importante de contaminación de metales pesados como el plomo. Taxco de Alarcón, Gro., es uno de los principales productores metalúrgicos de plata y otros metales en México; sin embargo, esta actividad ha generado grandes cantidades de residuos con altas concentraciones de metales, entre ellos el plomo (Pb). El Pb está asociado a daño a nivel neuropsicológico, hepático, renal, hematológico y genotóxico. La acumulación de estos metales en el suelo ha generado riesgo para los individuos que viven en las cercanías de las minas. El objetivo de esta investigación fue evaluar el daño genotóxico en mujeres que están expuestas a metales. La genotoxicidad fue evaluada mediante la técnica del ensayo cometa. Se analizaron 44 muestras sanguíneas de mujeres expuestas a residuos mineros, de las cuales se cuantificaron los parámetros de porcentaje de ADN en cola y el olive tail momento (OTM) de 50 células por duplicado, los resultados mostraron que las mujeres expuestas a residuos presentaron daño al ADN de acuerdo al OTM. El porcentaje de ADN en cola mostró que las mujeres tienen un daño moderado.

Residuos mineros, Daño al ADN, Ensayo cometa, Taxco de Alarcón

Abstract

The mining industry represents an important source of contamination of heavy metals. Taxco of Alarcón, Gro., it is one of the principal metallurgical producers of silver, and other metals in Mexico; however, this activity has generated big quantities of residues with high concentrations of metals, such as lead (Pb). Pb are associated to damage neuropsychological, hepatic, renal, hematologic and genotoxic. The accumulation of these metals in the soil has generated risk for individuals living near the mines. The objective was evaluating the genotoxic damage of women exposed to metals. Genotoxic damage was evaluated by comet assay technique. We analyzed 44 blood samples of women exposed. The parameters evaluated were tail DNA percentage and olive tail moment (OTM) from 50 cells by duplicate. The result of tail DNA percentage showed the women have moderate DNA damage.

Tailings, DNA Damage, Comet assays, Taxco de Alarcón

Citación: SALAS, Vanessa, LÓPEZ, Jenny, VÁZQUEZ, Analinne, TALAVERA-MENDOZA, Oscar, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena. Daño genotóxico en mujeres de la población de Taxco de Alarcón Guerrero. Revista de Ciencias de la Salud 2015, 2-4: 87-91

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: Vannezhiitha.ruiz@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

Los metales pesados son un grupo de elementos que tienen un alto peso molecular con una densidad mayor de 5 $\mu\text{g/mL}$ (INECC, 2009). Los metales se caracterizan y se distinguen de los no metales por sus propiedades físicas, la capacidad para conducir el calor, y una resistencia eléctrica que es directamente proporcional a la temperatura, maleabilidad, ductibilidad y brillo (Appenroth, 2010). El Pb es un metal no esencial para los seres humanos que se distribuye con amplitud en el ambiente; se considera un contaminante ecotoxicológico ya que su uso provoca contaminación ambiental y exposición en humanos (Manzanares-Acuña et al., 2006). Debido a sus diversas funciones el plomo tiene una gran importancia industrial, además su alta resistencia a la corrosión promueve su uso en la construcción, en la industria química, etc. Debido a la variedad de aplicaciones que posee el Pb, la exposición a Pb es inocua, representando riesgo a la salud de la población por los efectos tóxicos que puede provocar (Coria et al., 2009; Flores-Ramírez et al., 2012).

Una fuente importante de exposición es mediante el uso habitual y doméstico de artículos que contienen Pb como lo son; esmaltes, pinturas, plaguicidas, vajillas de cristal, esmalte cerámico, artículos de joyería, juguetes y algunos cosméticos y a través de los residuos mineros (Patrick, 2006; Singh et al., 2014). El Pb es un elemento de reconocida capacidad tóxica que afecta a toda la población, alterando sistema nervioso central, hematológico y a nivel renal (Flores-Ramírez et al., 2012).

El municipio de Taxco de Alarcón, Gro., se encuentra ubicado al sur de México y es uno de los mayores productores de metales como Ag, Au, Pb, entre otros (Armenta et al., 2003; Talavera Mendoza et al., 2006; Talavera et al., 2005).

En esta zona, la actividad minera tiene más de 450 años de manera intensa y ha dado lugar a la acumulación de grandes cantidades de jales en las zonas circundantes. Algunos de estos jales están ubicados cerca o dentro de las ciudades pequeñas, y su presencia es motivo de preocupación ambiental y de salud.

Además un estudio en población infantil de la zona mostró que el 100% de los niños estudiados presentaron valores por encima de los valores de referencia para algunos metales como Pb, cadmio (Cd) y arsénico (As) (Moreno et al 2010), los cuales son genotóxicos. Por esa razón el objetivo del presente trabajo fue evaluar el daño genotóxico en mujeres en edad reproductiva que viven en la región de Taxco, Gro. Mex.

Metodología

Selección de la Población y obtención de la Muestra

Se colectaron 44 muestras de mujeres residentes de las comunidades de "El Fraile y Santa Rosa" del municipio de Taxco de Alarcón Gro., quienes no estuvieran embarazadas y sin enfermedades infecciosas, antes de dos semanas de la toma de la muestra, así como no haber ingerido antibióticos.

La muestra sanguínea se obtuvo por venopunción con el anticoagulante heparina de sodio. Cada mujer se les aplicó una encuesta para evaluar factores socioeconómicos y se firmó su carta de consentimiento informado después de conocer los objetivos del proyecto.

Ensayo Cometa

Para el ensayo cometa las laminillas fueron preparadas por duplicado para cada individuo. Para realizar las laminillas, 20 μL de sangre fueron embebidas en agarosa debajo punto de fusión (0,5%) y se depositaron en portaobjetos previamente cubiertos con 150 μL de agarosa 0,5% de punto de

fusión normal.

Posteriormente, los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2,5 M, Na₂EDTA 100mM, Tris 10 mM, DMSO 10% y Tritón X100 1% adicionado previo a su uso,) durante 1 h. Luego se procedió al tratamiento alcalino para llevar a cabo el desenrollamiento del ADN (NaOH 300 mM, 1mM Na₂EDTA,) éste se realizó por 20 min, antes de la electroforesis llevándose a cabo bajo las siguientes condiciones a 4°C, 25 V (0.73 V/cm) y 300 mA durante 20 min. Posteriormente después, las laminillas fueron lavadas con una solución neutralizante pH 7.4 (Tris 0.4 M).

Análisis de las laminillas

Para la lectura, las laminillas se tiñeron con bromuro de etidio 30 µg/mL y se observaron en un microscopio de fluorescencia equipado con un excitador de 515-560 nm. Cada laminilla fue analizada, mediante el software CometAssay IV, versión 4.3 para el análisis de imágenes, en un recuento total de 50 células por laminilla, determinando el Olive Tail Moment (OTM) (relación de AND en la cola del cometa y el porcentaje de ADN en núcleo), y el porcentaje de ADN en cola (Tail % intensity).

Resultados

Se captó un total de 44 muestras procedentes de las poblaciones de El Fraile y Santa Rosa pertenecientes al municipio de Taxco de Alarcón, Gro.

El promedio de edad de la población fue de 34.68 ± 8.99 años, con un tiempo de residencia de 26.78 ± 14.03 años en las localidades de estudio. Se observó también que el 40.9% de la población es fumadora pasiva y más del 75% utiliza loza de barro brillante para la cocción de sus alimentos, tabla 1.

Para determinar el daño del ADN mediante el ensayo cometa se observó un ligero

daño en las muestras analizadas.

Presentan daño al ADN de acuerdo con la determinación del Olive Tail Moment (OTM) (>1.5) (Grafico I) y de acuerdo con el porcentaje de ADN en cola (Grafico II) se observó que las laminillas presentaron valores elevados (más del 20% de porcentaje de ADN en la cola del cometa). El daño genotóxico se clasificó de acuerdo a lo reportado por Molleret al., 2000 y Milena et al., 2005 quien las clasifica de manera cualitativa 0 - 0.5 % sin daño, 5 - 20% bajo nivel de daño, 20 - 40% daño medio o moderado, de 40 - 80 % daño elevado, >80 % daño extremo, encontrando que más del 50% de la población en estudio presentan daño moderado

	Población total n=44	El fraile n=35	Santa Rosa n=9
Edad (años)	34.68 ± 8.99	34.71 ± 9.54	34.53 ± 6.87
Tiempo de residencia (años)	26.78 ± 14.03	27.07 ± 14.99	25.65 ± 10.10
Tabaquismo			
Activo	3 (6.81%)	3 (8.57%)	-
Pasivo	18 (40.9%)	12 (34.28%)	6 (66.66%)
Alcoholismo	1 (2.27%)	1 (2.85%)	-
Uso de loza de barro	33 (75%)	24 (68.57%)	9 (100%)
Taller de metales en casa	2 (4.54%)	1 (2.85%)	2 (22.22%)

Tabla 1 Características de la población en estudio.

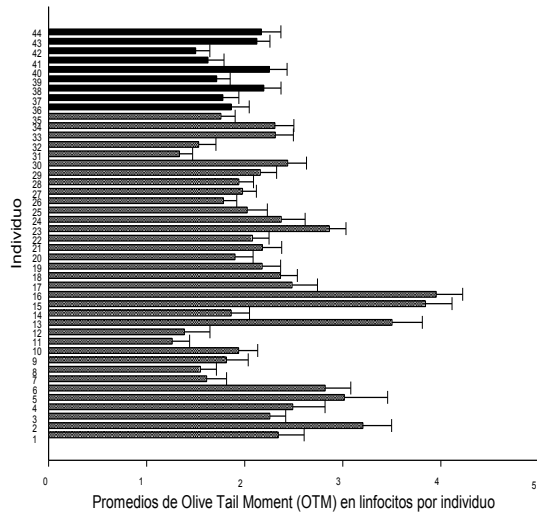


Grafico 1 Promedio del Olive Tail Moment (OTM) en linfocitos, por individuo. La barra hace referencia al error estándar de cada individuo.

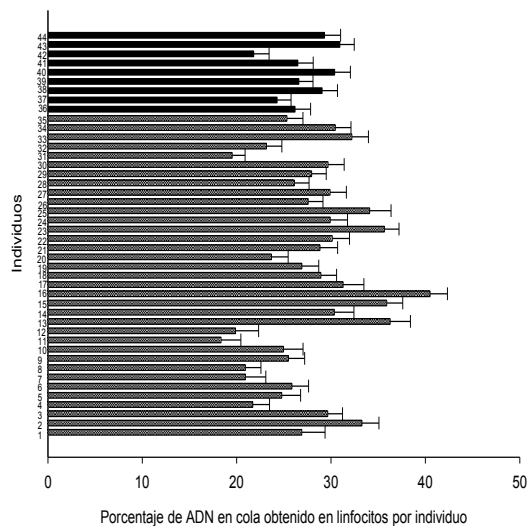


Grafico 2 Porcentaje de ADN en la cola en linfocitos, de la población de estudio. Se muestran los valores obtenidos de % de ADN en cola de cada individuo. La barra hace referencia al error estándar de cada individuo.

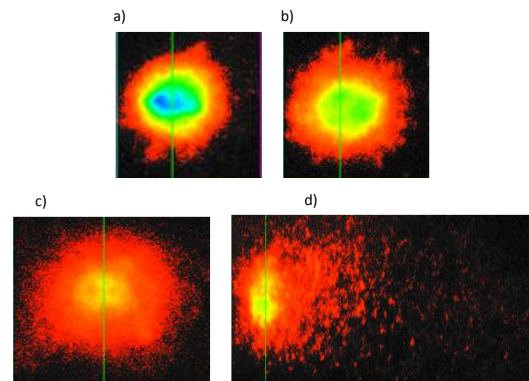


Figura 1 Fotografías tomada con el software cometassayIVa 20x. Análisis cualitativo. a) Sin daño. b) bajo nivel de daño. c) Daño medio o moderado. d) Daño elevado.

Conclusiones

El porcentaje de ADN en cola fue de 27.82% en la población, lo que indica que presentó un daño moderado; sin embargo es necesario realizar más estudios que nos permitan identificar si este daño está relacionado con la exposición a metales pesados, como el plomo.

Referencias

Appenroth, K.-J., (2010). Soil Heavy Metals, Soil Biology. I. Sherameti and A. Varma (Eds.). Springer (pp. 19-29) Berlin, Heidelberg.

Armenta, M.A., Talavera, O., Morton, O., Barrera, M., (2003). Geochemistry of metals from mine tailings in Taxco, Mexico. Bull. Environmental Contamination and Toxicology. 71, 387–93.

Coria, C., Cabello, A., Tassara, E., López, E., Rosales, H., Pérez, M., Zavala, C., Muñoz, P., Orellana, G., Inostroza, M.I., Contreras, L., Kirsten, L., (2009). [Long term consequences among children exposed to lead poisoning]. Rev. Med. Chile. 137, 1037–44.

Flores-Ramírez, R., Rico-Escobar, E., Núñez-Monreal, J.E., García-Nieto, E., Carrizales, L., Ilizaliturri-Hernández, C., Díaz-Barriga, F., (2012). Exposición infantil al plomo en sitios contaminados. *Salud Publica de México*. 54(4), 383–392.

INECC, Instituto Nacional de Ecología y Cambio climático., (2009). Metales Pesados. Consultado el 29 de octubre del 2014, <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/763-aqre-metales>.

Manzanares-Acuña, E., Vega-Carrillo, H.R., Salas-Luévano, M.Á., Hernández-Dávila, V.M., Letechipía-de León, C., Bañuelos-Valenzuela, R., (2006). Niveles de plomo en la población de alto riesgo y su entorno en San Ignacio, Fresnillo, Zacatecas, México. *Salud Publica de México*. 48, 212–219.

Milena, C. Cortés, A.C., Sicard, D.M., Restrepo, H. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *BioMed*.25, 335-45.

Moller, P. Knudsen, S. Loft, H. Wallin (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-Damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer epidemiol Biomarkers*. 9, 1005-1015.

Moreno, M.E., Acosta-Saavedra, L.C., Meza-Figueroa, D., Vera, E., Cebrian, M.E., Ostrosky-Wegman, P., Calderon-Aranda, E.S., (2010). Biomonitoring of metal in children living in a mine tailings zone in Southern Mexico: A pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 213(2), 252–258.

Patrick, L., (2006). Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Alternative Medicine Review*. 11(1), 2–22.

Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R., (2014). Heavy metals and living systems: An overview. *Indian Journal of Pharmacology*. 43(3), 246–53.

Talavera Mendoza, O., Armienta Hernández, M.A., Abundis, J.G., Mundo, N.F., (2006). Geochemistry of leachates from the El Fraile sulfide tailings piles in Taxco, Guerrero, southern Mexico. *Environ. Geochem. Health* 28, 243–55.

Talavera, O., Yta, M., Moreno, R., Doto, A., Flores, N., Duarte, C., (2005). Mineralogy and geochemistry of sulfide-bearing tailings from silver mines in the Taxco, Mexico area to evaluate their potential environmental impact. *Universidad Nacional Autónoma de México. Geofísica International*. 44(991), 49–64.

El polimorfismo Q192R de la Paraoxonasa 1 como modulador del efecto oxidativo del plaguicida Metamidofos en células mononucleares de sangre periférica

RAMÍREZ-VARGAS, Marco Antonio*†, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo, FLORES-ALFARO, Eugenia, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena

Recibido 16 Enero, 2015; Aceptado 27 Agosto, 2015

Resumen

Objetivo: El objetivo fue determinar si las variantes genéticas del polimorfismo Q192R de la Paraoxonasa 1 (PON1) puede modular el efecto oxidativo del metamidofos en células mononucleares humanas de sangre periférica. Se utilizaron cultivos de células mononucleares humanas de sangre periférica (PBMC) de hombres con diferentes genotipos del polimorfismo Q192R del gen de la PON1 los cuales fueron expuestos a diferentes dosis de metamidofos (MET), las variante polimórfica fueron determinadas por PCR convencional y PCR en tiempo real (Q192R). La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y niveles de malonaldehído se evaluaron como biomarcadores de estrés oxidativo. El presente estudio muestra que los diferentes genotipos del polimorfismo Q192R de la PON1 podrían no ser modulares del estrés oxidativo inducido por metamidofos en PBMC.

Paraoxonasa 1, metamidofos, estrés oxidativo, plaguidas organofosforados

Abstract

Objective: The objective was to determine whether genetic variants of Q192R polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) can modulate oxidative effect of methamidophos in human peripheral blood mononuclear cells. Were used cultures of human mononuclear cells of peripheral blood (PBMC) of men with different genotypes of Q192R polymorphism in the PON1 gen, the cultures were exposed to different doses of methamidophos (MET), the variants of Q192R polymorphisms were determined using the conventional PCR and in real time PCR, the production of reactive oxygen species (ROS) and malonaldehyde levels were evaluated as biomarkers of oxidative stress. The present study shows that different genotypes of the PON1 could not be modular oxidative stress induced by methamidophos in PBMC.

Paraoxonase 1, methamidophos, oxidative stress, organophosphorus pesticides

Citación: RAMÍREZ-VARGAS, Marco Antonio, HUERTA-BERISTAIN, Gerardo, FLORES-ALFARO, Eugenia, MORENO-GODINEZ, Ma. Elena. El polimorfismo Q192R de la Paraoxonasa 1 como modulador del efecto oxidativo del plaguicida Metamidofos en células mononucleares de sangre periférica. Revista de Ciencias de la Salud 2015, 2-4: 92-98

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico:emoreno20@hotmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

El estrés oxidativo como un probable mecanismo de toxicidad, inducido por la exposición a plaguicidas organofosforados (OP), se ha evidenciado en estudios realizados *in vivo* e *in vitro* (Elsharkawy, Yahia, & El-Nisr, 2014), siendo factores importantes el grado de toxicidad y tiempo de exposición al OP (Muniz et al., 2008). En este sentido evidencia epidemiológica ha demostrado que el grado de estrés oxidativo también es modulado por factores intrínsecos del individuo, en los que destacan la actividad detoxificante de algunas enzimas (Povey, 2010). La paraoxonasa 1 (PON1) es una enzima detoxificante que modula la toxicidad de los OP por la hidrólisis de los compuestos oxonificados generados durante su metabolismo (Jokanović, 2001). Este efecto se ha evidenciado en modelos animales, y en estudios observacionales de población ocupacionalmente expuesta (Goel et al., 2012).

Se conoce que existe una gran variación interindividual de la actividad enzimática de PON1, esta la cual se ha asociado con la presencia de diferentes polimorfismos en el gen de PON1, entre ellos el polimorfismo -108T/C, el cual se ha asociado con variaciones en los niveles de expresión de la enzima (Deakin, Leviev, Brulhart-Meynet, & James, 2003), el L55M asociado con variaciones en la estabilidad del enzima (Leviev, Deakin, & James, 2001) y el polimorfismo Q192R el cual se asocia con diferencias en la capacidad y especificidad hidrolítica (Davies et al., 1996). Se ha determinado que individuos con una actividad baja de PON1 son más susceptibles a los efectos tóxicos de OP (Richter, Jarvik, Furlong, & Furlong, 2010). Por lo cual se ha propuesto a la PON1 como un bio-marcador de susceptibilidad a la toxicidad de los OP (Costa, Cole, Jansen, & Furlong, 2008).

La PON1 también es considerada como una enzima antioxidante endógena, involucrada principalmente en la hidrólisis de lipoproteínas de baja densidad oxidadas es capaz de reducir el estrés oxidativo en células mononucleares, cuando estas son expuestas a condiciones proaterogénicas (Rozenberg, Shih, & Aviram, 2005).

Sin embargo no existe evidencia si la PON1 es capaz de reducir el estrés oxidativo inducido por la exposición a OP en células mononucleares. El metamidfos (MET, O, S-dimetilfosforamidotiodato) es un OP, ampliamente utilizado en el mundo, en México es el tercer plaguicida más usado y a nivel estatal es el plaguicida más usado en la agricultura.

Recientemente se ha demostrado que el MET es capaz de inducir estrés oxidativo en PBMC en forma dosis-dependiente (datos personales), sin embargo, no existen reportes donde se evaluó el papel de las variantes genéticas de la PON1 como moduladores de la susceptibilidad al estrés oxidativo inducido por la exposición a MET en PMBC. Por lo cual el objetivo del presente trabajo fue evaluar si el estrés oxidativo inducido por MET en PMBC es modulado por las variantes genéticas en el gen de PON1.

Material y métodos

Sujetos

La selección de los participantes se realizó en base a las variantes polimórficas del gen de PON1 que presentaron los participantes, además de no tener antecedentes de exposición laboral a plaguicidas, consumo de alcohol, consumo de antioxidantes (vitaminas).

Determinación de las variantes genéticas de**PON1**

Los participantes fueron donadores masculinos clínicamente sanos (n=10), con edades de 21 a 25 años. La participación de cada sujeto fue voluntaria y se solicitó un consentimiento informado de cada uno de los sujetos participantes de acuerdo a las recomendaciones de la Declaración de Helsinki.

Cultivo Celular

Las PBMC se obtuvieron por el método de Ficoll-Hypaque-1077, siguiendo el procedimiento especificado por el fabricante. PBMC se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco ®) suplementado con suero bovino fetal al 5% (Gibco ®), 2 mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibiótico/antimicótico (100 unidades de penicilina, estreptomycin 0,1 mg, 0,25 mg de anfotericina, la incubación se realizó a 37 ° C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂.

Las células se estabilizaron durante un período de 24 h antes de cada prueba. Las dosis empleadas en el ensayo fueron determinadas en base a una curva-dosis-respuesta curso temporal. Utilizando dosis de relevancia biológica de 3, 10 y 20 mg/L, las cuales no inducen efecto citotóxico en PBMC.

Plaguicida

Se utilizó el metamidofos (CAS # 10265-92-6) grado analítico (pureza 97.7%) Sigma-Aldrich (Seelze, GER), este fue disuelto en DMSO grado biología molecular (pureza 99.9%), considerando que el contenido del solvente fuera menor al 1% del volumen final del cultivo.

El DNA leucocitario se extrajo por la técnica rápida no enzimática de Miller et al., (1988). La determinación del polimorfismo Q192R (rs662) fue realizada mediante la técnica de PCR en tiempo real, usando el sistema de detección de secuencias ABI prism 7500. Se utilizaron los reactivos de TaqMan Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems), las condiciones de la genotipificación fueron realizadas según Rojas-Garcia et al., (2005).

Se utilizaron 36µM de iniciadores específicos (iniciador sentido CTGAGCACTTTTATGGCACAAATGA e iniciador antisentido ACCACGCTAAACCCAAATACATCTC), 8µM de sondas fluorogénicas (VIC CCTACTTACAATCCTG y FAM CCCTACTTACGATCCTG). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando 5µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (el cual contiene la enzima AmpliTaq Golden ADN Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs con dUTP) y 20 ng de DNA genómico. La mezcla fue completada con 10µL de agua estéril, las condiciones de ciclaje fueron 50° C por 2min, 95° C por 10 min y 40 ciclos de: 95° C por 15 seg y 60° C por 1 min.

Determinación de ROS totales

La generación intracelular de especies reactivas del oxígeno se determinó utilizando la sonda fluorogénica CellROX® Green (Life Technologies, Eugene, OR) siguiendo la especificaciones del fabricante, 1.25 X10⁶ células por mL (en placas de 96 pozos en un volumen final 200 µL) fueron expuestas a MET (3, 10 o 20 mg/L) durante 6 h, posteriormente se agregó 5 µM de CellROX y se incubó durante 30 min, seguido de tres lavados con PBS.

Las células fueron resuspendidas en 3 mL PBS, la fluorescencia fue determinada a 485/520 nm utilizando el citómetro de flujo FACS-Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se determinaron 100 000 eventos por condición ensayada el análisis fue realizado utilizando el software FACSDIVA V 6.1.3 (Becton Dickinson).

Cada condición se realizó por duplicado en dos momentos independientes. En cada ensayo se utilizaron controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Lipoperoxidación

El daño lipoperoxidativo fue evaluado mediante la cuantificación de malonaldehído (MDA) utilizando el kit "LOP-FR 12" (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI), este ensayo se basa en la reacción del reactivo cromogénico N-metil-2-fenilindol con el MDA a 45°C el resultando en un compuesto cromogénico, para ello 12 X10⁶ cél/mL (en placas de 24 pozos en un volumen final de 500µL) se expusieron a 3, 10 o 20 mg/L de MET por 24 h posteriormente el medio fue removido y se realizaron lavados con PBS, las células fueron recuperadas en tubos y se adicionó 20 µl de Tris-HCl al 50 mM a pH 7.4, seguidas de 5 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido/baño maría a 45 °C.

Seguido de la adición de 15 µL de N-metil-2-fenilindol y 15 µL de ácido clorhídrico 12 N. Esta mezcla fue incubada por 1 h a 45°C después los tubos fueron centrifugados a 14 000 r.p.m. por 15 min, el sobrenadante fue recuperado y la absorbancia fue determinada a 586 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Atlanta, GO).

Las concentraciones de MDA generadas fueron calculadas en base a una curva estándar. Cada condición se realizó por duplicado en dos experimentos independientes. En cada ensayo se utilizaron controles basales (células en medio de cultivo) y controles de vehículo (células con <1 % de DMSO).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico STATA versión 13.0 (College Station, TX). Las variables fueron representadas como medias y errores estándar, la diferencia entre los niveles de especies reactivas del oxígeno y malonaldehído en los diferentes genotipos fue realizada mediante comparación de ANOVA y comparación múltiple de Dunnett.

Especies Reactivas del Oxígeno ^u				
Condición	RR(n=4)	QR(n=3)	QQ(n=3)	p*
Basal	9081.8(238.4)	5066(840.4)	10190.2(1870)	0.2
0 mg/L	7658.9(1863)	5509.9(1313.8)	4166.9(1782.9)	0.4
3 mg/L	20562.5(4256.4)	14552.2(2045)	18669.5(5455.9)	0.3
10 mg/L	25493.7(3346)	28272.7(4006)	35367.5(3030)	0.1
20 mg/L	52611.9(12586.6)	46084.8(7195.6)	54035.2(4803.2)	0.3

Tabla 1 Efecto de las variantes polimórficas en Q192R del gen de PON1 en la modulación de las especies reactivas del oxígeno posterior a la exposición a metamidofos. Los datos son representados en medias y (error estándar), correspondientes a los resultados por duplicado de dos experimentos independientes, control de vehículo "DMSO" (0 mg/L), ^u intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias), * valor de p estimado por ANOVA.

Resultados

El MET a 20 mg/L incrementó la producción de especies reactivas del oxígeno 8.6 veces más en PBMC en comparación con el control de vehículo. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon los niveles de especies reactivas del oxígeno por genotipo presente en el polimorfismo Q192R (Tabla 1).

En relación a MAD, la exposición a 20 mg/L de MET incremento 29 veces más los niveles de MAD en comparación con el control de vehículo dichos niveles no se asociaron a la presencia de alguna variante genotípica del polimorfismo Q192R en el gen PON1 (Tabla 2).

Condición	Malonaldehido ^ω			p*
	RR (5)	QR(3)	QQ(2)	
Basal	0.29(0.67)	0.53(0.21)	0.76(0.26)	0.5
0 mg/L	0.15(0.37)	0.40(0.25)	0.79(0.23)	0.5
3 mg/L	3.03(1.15)	1.70(1.13)	5.29(6.04)	0.6
10 mg/L	8.99(2.60)	4.14(0.88)	8.87(8.76)	0.5
20 mg/L	14.77(1.60)	14.71(2.98)	13.71(5.90)	0.9

Tabla 2 Efecto de las variantes polimórficas en Q192R del gen de PON1 en la modulación de los niveles de malonaldehidoposterior a la exposición a metamidofos. Los datos son representados en medias y (error estándar), correspondientes a los resultados por duplicado de dos experimentos independientes, control de vehículo “DMSO” (0 mg/L), ω malonaldehido (μM) contenido en 6 X 10 6 PBMC, * valor de p estimado por ANOVA

Discusión

La exposición a OP se ha asociado con la inducción de estrés oxidativo (Lukaszewicz-Hussain, 2010) y este a su vez puede ser modulado por la capacidad detoxificante de cada individuo. Una de las enzimas detoxificantes de OP es la PON1, cuya actividad es influenciada por variantes polimórficas. En el presente estudio se evaluó si el estrés oxidativo inducido por MET en PMBC es modulado por variantes genotípicas del polimorfismo Q192R de PON1, los resultados sugieren que los niveles de ROS y MDA no son influenciados por el genotipo presente en el polimorfismo Q192R.

Uno de los principales polimorfismos de la PON1 asociados con la susceptibilidad a OP es el Q192R, este se localiza en el sitio catalítico del enzima, por lo que la presencia de una u otra isoforma cambiara la afinidad y especificidad a su sustrato. Se ha demostrado que los individuos con el polimorfismo RR tiene una mayor actividad paraoxonasa, además de tener una mayor actividad hidrolítica frente a los oxones del clorpirifos, y otros OP, en comparación con la isoenzima QQ (Costa et al., 2008).

Al comparar los niveles de MDA y ROS con los entre los diferentes genotipos del polimorfismo Q192R la diferencia no fue significativamente entre los genotipos considerados, los niveles basales de ROS y MDA fueron más bajos en los portadores RR>QR>QQ, estos datos fueron consistentes con los reportados por Kotani, Tsuzaki, & Sakane, (2012) al analizar los metabolitos del oxígeno en un estudio clínico. Sin embargo cuando las células fueron expuestas a un insulto toxico como es la adición del MET se observó que las variaciones en MDA fueron discretamente menores en el genotipo QQ, esto puede atribuirse a dos probables mecanismos:

Primero, se ha evidenciado que el genotipo QQ es mejor hidrolizante de los lipoperoxidos (Sozmen, Sagin, Kayikcioglu, & Sozmen, 2008), lo cual podría explicar porque los niveles más altos de MDA fueron asociados al genotipo RR. El segundo mecanismo que podría ocurrir es que la isoforma QQ fuese mejor hidrolizante del MET.

Lo cual se ha hipotetizado en población mexicana, en agricultores expuestos principalmente a MET donde se observó que los portadores del genotipo QQ presentaron menores efectos tóxicos asociados a la exposición al MET (Pérez-Herrera et al., 2008).

Sin embargo estudios in vivo (Moser, 1999), 1999) e in vitro (Padilla, Buzzard, & Moser, 2000) han sugerido que el MET no es metabolizado por las esterasas de tipo A dentro de las cuales se encuentra la PON1, sin embargo el metabolismo del MET no es muy claro. Más estudios deben ser realizados para dilucidar si la PON1 es o no una enzima implicada en el metabolismo del MET y establecer en cuál es la isoforma de PON1 que hidroliza mejor al MET.

Conclusiones

De los datos obtenidos en el presente estudio sugieren que las variantes genotípicas en el polimorfismo Q192R de PON1 no modulan el estrés oxidativo inducido por la exposición a MET, sin embargo para poder afirmar esta conclusión es necesario la implementación de estudios en los que el número de muestra sea mayor.

Referencias

Costa, L. G., Cole, T. B., Jansen, K. L., & Furlong, C. E. (2008). Paraoxonase (PON1) and Organophosphate Toxicity. In B. Mackness, M. Mackness, M. Aviram, G.

Paragh, A. Ridley, & J. Frampton (Eds.), *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism* (Vol. 6, pp. 209–220). Springer Netherlands.

Davies, H. G., Richter, R. J., Keifer, M., Broomfield, C. A., Sowalla, J., & Furlong, C. E. (1996). The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genetics*, 14(3), 334–336.

Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(2), 145–150.

Deakin, S., Leviev, I., Brulhart-Meynet, M.-C., & James, R. W. (2003). Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position –107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochemical Journal*, 372(2), 643.

Elsharkawy, E. E., Yahia, D., & El-Nisr, N. A. (2014). Chlorpyrifos induced testicular damage in rats: Ameliorative effect of glutathione antioxidant. *Environmental Toxicology*, 29(9), 1011–1019.

Goel, Parul, Goel, Kapil, Singh, Surjit, Bhalla, Ashish, Sharma, Navneet, Gill, K. D., & Bandyopadhyay, Debapriya. (2012). Role of paraoxonases in detoxification of organophosphates. *Journal Of Advance Researches In Biological Sciences (A Peer Reviewed Indexed Medical Journal)*, 4(4), 320–325.

- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166(3), 139–160.
- Kotani, K., Tsuzaki, K., & Sakane, N. (2012). Paraoxonase-1 Gene Q192R Polymorphism and Reactive Oxygen Metabolites. *Journal of International Medical Research*, 40(4), 1513–1518.
- Leviev, I., Deakin, S., & James, R. W. (2001). Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *Journal of Lipid Research*, 42(4), 528–535.
- Moser, V. C. (1999). Comparison of Aldicarb and Methamidophos Neurotoxicity at Different Ages in the Rat: Behavioral and Biochemical Parameters. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157(2), 94–106.
- Muniz, J. F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y. W., ...Kisby, G. E. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 227(1), 97–107.
- Padilla, S., Buzzard, J., & Moser, V. C. (2000). Comparison of the role of esterases in the differential age-related sensitivity to chlorpyrifos and methamidophos. *Neurotoxicology*, 21(1-2), 49–56.
- Pérez-Herrera, N., Polanco-Minaya, H., Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M. J., Hernández-Ochoa, I., Rojas-García, E., ...Quintanilla-Vega, B. (2008). PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230(2), 261–268.
- Povey, A. C. (2010). Gene–environmental interactions and organophosphate toxicity. *Toxicology*, 278(3), 294–304.
- Richter, R. J., Jarvik, G. P., Furlong, C. E., & Furlong, C. E. (2010). Paraoxonase 1 Status as a Risk Factor for Disease or Exposure. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 660, 29–35.
- Rozenberg, O., Shih, D. M., & Aviram, M. (2005). Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis*, 181(1), 9–18.
- Sozmen, E. Y., Sagin, F. G., Kayikcioglu, M., & Sozmen, B. (2008). Oxidative Stress & Antioxidants and PON1 in Health and Disease. In B. Mackness, M. Mackness, M. Aviram, & G. Paragh (Eds.), *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism* (Vol. 6, pp. 61–73).

La exposición a Metamidofos altera la expresión de p53 en células MCF-10^a

SERAFIN, Jesús†, OLEA, Monserrat, ANTONIO, Veronica, MORENO, Elena

Recibido 19 Febrero, 2015; Aceptado 10 Agosto, 2015

Resumen

El metamidofos (MET) es un organofosforado (OPs) de amplio espectro, cuyo uso está prohibido o limitado en algunos países; sin embargo en México es uno de los OPsmas utilizados. Recientemente se ha observado que células de mama pueden ser blanco del efecto tóxico de algunos OPs, por lo cual se utilizó la línea celular MCF-10A para determinar si existe un daño citotóxico y si éste, está relacionado con la expresión de la proteína p53. La viabilidad celular se realizó mediante los métodos de rojo neutro y el ensayo de MTT. La expresión de p53 se realizó por western blot. El MET no alteró la viabilidad celular cuando ésta fue evaluada por el rojo neutro, sin embargo en el ensayo de MTT se observó que el metamidofos disminuye la viabilidad celular de las células MCF-10A a concentraciones de 10, 20, 200, 400 y 500 mg/L durante 48 h. Además el MET alteró la expresión de p53. Estos resultados sugieren que las células MCF-10A son un blanco del efecto citotóxico del MET, sin embargo se necesitan realizar más estudios.

Metamidofos, células de mama, organofosforados y p53

Abstract

Methamidophos is an organophosphate (OP) broad-spectrum, which is banned or restricted in some countries but in Mexico is one of the most used OPs. MET is the effect on the brain, in addition to various studies show that at the cellular level can cause oxidative stress and DNA damage. Recently it has been observed that breast cells may be targets the toxic effect of some OPs, whereby the cell line MCF-10A was used to determine whether a cytotoxic damage and if this is related to the expression of p53. Cell viability was performed by the methods of neutral red and MTT assay. P53 expression was performed by western blot. MET not alter cell viability when it was evaluated by neutral red, however in the MTT assay it was observed that methamidophos decreases cell viability of MCF-10A at concentrations of 10, 20, 200, 400 and 500 mg / L for 48 h. in the western blot impaired exprsion p53 was observed. These results suggest that the MCF-10A cells are a target of the cytotoxic effect of MET, but more studies are needed

Methamidophos, breast cells, organophosphates and p53

Citación: SERAFIN, Jesús, OLEA, Monserrat, ANTONIO, Verónica, MORENO, Elena. La exposición a Metamidofos altera la expresión de p53 en células MCF-10^a. Revista de Ciencias de la Salud 2015, 2-4:99-104

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

Las intoxicaciones por plaguicidas son reconocidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema de salud pública y se ha estimado que se producen tres millones de intoxicaciones agudas cada año y entre 80 000 a 220 000 defunciones al año (Shadnia et al., 2005).

El efecto tóxicos agudo de los plaguicidas organofosforados (OPs) ampliamente estudiado es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), sin embargo, en algunos casos los OPs pueden inducir estrés oxidativo y alteración de genes pertenecientes al ciclo celular, como mecanismo alterno de toxicidad (Roszczenko, et al., 2012).

En México uno de los OPs más utilizados es el Metamidofos (MET) (O-S-dimetilfosforamidotioato), un insecticida-acaricida de amplio espectro usado para el control de plagas en algodón, papa, lechuga, tabaco, etc., (SENASICA (2011; CICOPLAFEST 2013), sin embargo, debido a efectos citotóxicos mostrados, se ha prohibido en países como China, Gran Bretaña y Chile (Meng-Cheng et al., 2008; Shi et al., 2008). Estudios realizados en el grupo de trabajo del "Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental" de la UAGro, han mostrado que el MET, al igual que otros OPs (malatión, paratión y metilparatión), induce estrés oxidativo y daño genotóxico en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica de humanos.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) controlan diferentes procesos biológicos tales como proliferación y diferenciación celular y arresto del ciclo celular, además pueden desencadenar vías de señalización que conlleven a apoptosis (vía p53) (Valavanidis y Vlahogianni, 2006; Yu et al., 2008).

Este comportamiento ya se ha observado en otros OPs (Kashyap et al., 2011., Li et al; 2012). Sin embargo, el efecto del MET sobre la expresión de p53 es desconocido.

Además, pese a que uno de los blancos más importantes y ampliamente estudiados es el sistema nervioso (Scheme *et al.*, 2009), estudios recientes muestran que el tejido mamario puede ser blanco del efecto tóxico del MET.

Por tal motivo es importante identificar si el MET induce alteración en la expresión de p53, para conocer el mecanismo citotóxico que tiene este plaguicida sobre el tejido mamario.

Metodología

Cultivo celular de MCF-10^a

Las células MCF-10A se sembraron en medio DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino al 5%, EGF (100 µL), hidrocortisona (250 µL) e insulina (500 µL), a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

Los cultivos se mantuvieron por un periodo de 24 a 48 hrs para los ensayos posteriores.

Tratamiento de las Células con MET

El Metamidofos grado técnico con pureza del 97,7% (Sigma-Aldrich (Seelze, GER), se disolvió en DMSO pureza 99,9% (Sigma-Aldrich, Fulda, GER), el volumen final del disolvente es <1% en el cultivo celular. Los cultivos se trataron en un rango de concentración de 10-500 mg/L de MET por un período de 6, 12, 24 y 48 h.

Viabilidad celular

Ensayo de rojo neutro

El ensayo de Rojo Neutro (RN) se realizó siguiendo la metodología de Repetto et al., (2008). Las células MCF-10A se cultivaron en placas de 96 pocillos a una densidad celular de 25×10^4 células/mL, se estabilizaron durante 24 h y se expusieron a MET (10-500 mg/L), en un periodo de 6, 12, 24 y 48h.

Posteriormente se agregó rojo neutro ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) y se incubaron por 3 h. Se usó DMSO como control de vehículo. Las densidades ópticas se determinaron a 540 nm, utilizando un lector de placas Statfax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL).

Los experimentos se realizaron en dos momentos independientes por triplicado.

Ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

El ensayo de MTT se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Mossman (1983), con algunas modificaciones. Las células MCF-10A se sembraron a una densidad celular de 5×10^4 células/mL en placas de 96 pocillos, se estabilizaron 24 h y se expusieron a MET (10-500 mg/L).

Durante un periodo de 6, 12, 24 y 48h. Se agregó MTT y se incubó durante 2 horas. Las densidades ópticas se determinaron a 540 nm, utilizando un lector de placas Statfax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL).

Los experimentos se realizaron en dos momentos independientes por triplicado.

Determinación de p53 por Western blot

Lisados proteicos

Los cultivos celulares se lavaron con PBS 1X frío y las proteínas se obtuvieron con solución de lisis fría (NaCl 150 mM, Tris-HCl [pH 8] 50 mM, 1.0 % de Triton X-100, EDTA 5 mM, inhibidor de proteasas y PMSF).

Después de la incubación en hielo por 10 min, se hicieron pasajes repetidos del lisado por una jeringa de insulina y se centrifugó a 13,500 rpm a 4°C por 10 min.

El sobrenadante se recuperó en un tubo Eppendorf frío y se almacenó a -80°C hasta su análisis. Los lisados de proteínas se cuantificaron mediante Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Anticuerpos

El anticuerpo monoclonal utilizado en este estudio para el análisis de p53 fue el DO-1 (epítipo en TADI, residuos 21-25 de p53) y para el control de carga se usó anti β -actina. Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón y antichivo conjugados con peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, USA).

Western blot

Treinta microgramos del lisado de proteínas celulares totales fueron separados por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12%. Se usó el marcador de peso PageRuler Prestained Protein Ladder Plus (Fermentas International Inc, Burlington, Ontario, Canada).

Las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% y TBS 1X-Tween 20 por 1 h e incubadas toda la noche con los anticuerpos primarios anti-p53 (dilución 1:1000) y anti- β -actina (dilución 1:10000), seguido de hibridación de las membranas con los anticuerpos secundarios (anti-ratón; dilución 1:10000 y anti-chivo; dilución 1:20000) conjugados con peroxidasa y la señal se detectó mediante quimioluminiscencia de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Millipore, USA) en un scanner C-DiGit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences-Biotechnology, Lincoln, NE, USA).

Resultados

Los resultados de la viabilidad evaluada por rojo neutro mostraron que el MET no afectó la viabilidad de las células MCF10A en comparación con el control DMSO en ningún tiempo (Fig. 1). Sin embargo, cuando la viabilidad celular fue evaluada por el método de MTT, los resultados mostraron que el MET disminuyó la viabilidad celular a las 48 h en las concentraciones de 10, 20, 100, 200, 400 y 500 mg/L (Fig. 2).

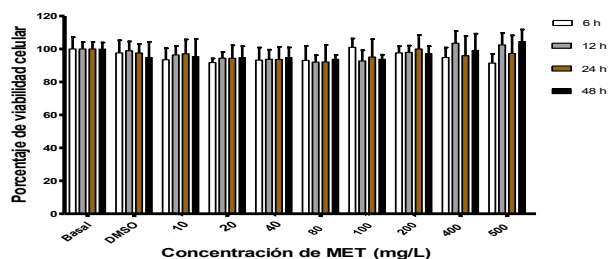


Gráfico 1 Gráfica dosis-respuesta curso-temporal del MET en células MCF10A expuestas a MET periodos de tiempo 6, 12, 24 y 48 h., mediante el ensayo de rojo neutro, los resultados se muestran en medias y error estándar, cada ensayo se realizó por triplicado en dos momentos independientes. Los resultados no muestran ninguna diferencia significativa en comparación al control DMSO.

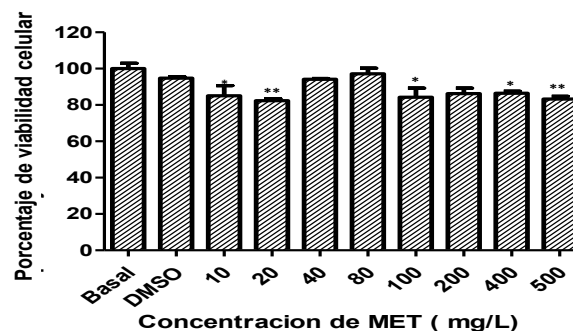


Gráfico 2 Efecto del MET sobre la viabilidad celular expuestas a distintas concentraciones de MET durante 48 h., mediante el ensayo de MTT. Los resultados se muestran en medias y desviación estándar, cada ensayo se realizó por triplicado. * $p < 0.05$ con respecto al control vehículo y ** $p < 0.001$ con respecto al control vehículo.

El MET alteró la expresión de p53 en células MCF10A a partir de las 12 h de tratamiento a las concentraciones de 10-80 mg/mL. Sin embargo se necesita hacer el análisis densitométrico de las bandas para estar seguro de la disminución o aumento de la proteína (Figuras 3-5)

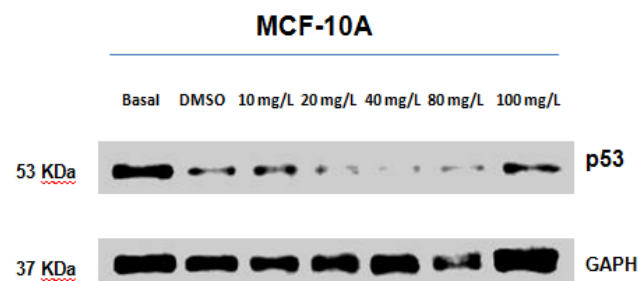


Figura 1 Western blot de extracto proteico de células MCF-10A expuestas a diferentes concentraciones de MET durante 12 h.

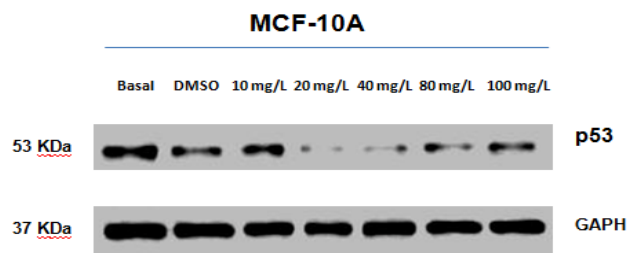


Figura 2 Western blot de extracto proteico de células MCF-10A expuestas a diferentes concentraciones de MET durante 24 h.

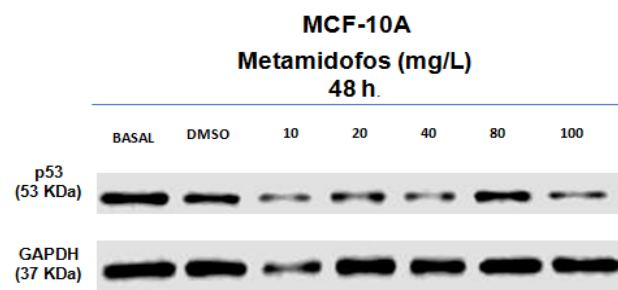


Figura 3 Western blot de extracto proteico de células MCF-10A expuestas a diferentes concentraciones de MET durante 48 h.

Conclusiones

El metamidofos disminuyó la viabilidad celular de las células MCF-10A a concentraciones de 10, 20, 200, 400 y 500 mg/L durante 48 h. de exposición cuando se evaluó con la técnica de MTT, pero no cuando se evaluó con la técnica de rojo neutro, lo cual sugiere que probablemente la mitocondria es el organelo blanco del MET, y no el lisosoma; sin embargo es necesario realizar más estudios para clarificar el mecanismo citotóxico del MET. El metamidofos alteró la expresión de p53 a partir de las 12 horas de tratamiento a una concentración de 20 mg/mL lo que sugiere que el efecto sobre p53 puede estar relacionado con la apoptosis que se ha visto inducida por el MET, pero es necesario realizar más experimentos.

Referencias

CICOPLAFEST (2013). Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas y Sustancias Tóxicas.

Repetto G., Del Peso A., Zurita J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature protocols*, Vol.3 No.7, 1121-1131.

Kashyap, M. P., Singh, A. K., Kumar, V., Tripathi, V. K., Srivastava, R. K., Agrawal, M., ... Pant, A. B. (2011). Monocrotophos induced apoptosis in PC12 cells: role of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s. *PloS one*, 6(3), e17757. doi:10.1371/journal.pone.0017757

Li Tianwei, Zhao Hongtao, Guo-Chiuan Hung, Jing Han, Shien Tsai, Bingjie Li, Jing Zhang, Raj K Puri and Shyh-Ching Lo. (2012). Differentially expressed genes and pathways induced by organophosphates in human neuroblastoma cells. *ExpBiol Med* (Maywood) 2012 237: 1413.

Meng-Cheng, Ye-Hao L., Qiong W., Ming G., Xiao-Mei H., Yan-Jun P., Shuijin H., Yong-Hua Y. (2008). Impacts of Methamidophos on the biochemical, catabolic, and genetic characteristics of soil microbial communities. *Elsevier*, 778-788.

Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

Valavanidis A., Vlahogianni T. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178-189.

Roszczenko, A.; Rogalska, J.; Moniuszko-

Jakoniuk, J.; Brzóška, M. M. The effect of exposure to chlorfenvinphos on lipid metabolism and apoptotic and necrotic cells death in the brain of rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2012, id:10.1016/j.etp.2012.03.002.

Scheme, N. R., Agricultural, F. O. R., Chemicals, V., Program, C. R., Of, R., & Mammalian, T. H. E. (2009). For agricultural and veterinary chemicals chemical review program review of the mammalian toxicology and metabolism / toxicokinetics of prepared by the methamidophos.

SENASICA (2011). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., Jalali, N. & Abdollahi, M. (2005) Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Hum Exp Toxicol*, 24, 439-45.

Shi, C., Zhao, S., Zhang, K., Hong, G., Zhu, Z. (2008). Preparation of colloidal gold immunochromatography strip for detection of methamidophos residue. *J Environ Sci (China)*, 20, 1392-7.

Yu, F., Wang, Z., Ju, B., Wang, Y., Wang, J., Bai, D. (2008). Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology* 59, 415-423.

Prevalencia de trichomonas vaginales en mujeres embarazadas que asisten al laboratorio del Hospital San Roque Villazón

LEZ-VILLAFUERTE, Alvino†, MAMANI-Marice

Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca.

Recibido 17 Enero, 2015; Aceptado 11 Agosto, 2015

Resumen

La tricomonosis es una enfermedad causada por el parásito *Trichomonas vaginalis* es importante porque es causante de vaginitis y demás síntomas; que es prevalente en mujeres en etapa sexual activa; también afecta a hombres ancianos y a mujeres embarazadas; porque son consideradas; susceptible de diferentes enfermedades al ser la enfermedad causante de partos prematuros y pérdida del neonato.

Trichomoniasis, mujeres embarazadas, campañas de salud**Abstract**

Trichomoniasis is a disease caused by the parasite *Trichomonas vaginalis*. It is important because it is the cause of vaginitis; which is one of the most prevalent diseases in sexually active women. This organism also affects elderly men and pregnant women, as they are considered susceptible to different diseases.

Trichomoniasis, pregnant women, health promotion

Citación: LEZ-VILLAFUERTE, Alvino, MAMANI, Marice. Prevalencia de trichomonas vaginales en mujeres embarazadas que asisten al laboratorio del Hospital San Roque Villazón *Revista de Ciencias de la Salud* 2015. 2-4: 105-109

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La tricomonosis es una enfermedad causada por el parásito *Trichomonas vaginalis* es importante porque es causante de vaginitis y demás síntomas; que es prevalente en mujeres en etapa sexual activa; también afecta a hombres ancianos y a mujeres embarazadas; porque son consideradas; susceptible de diferentes enfermedades al ser la enfermedad causante de partos prematuros y pérdida del neonato.

Es una de las enfermedades de transmisión sexual (ETS) que es fácilmente difusible, porque la forma de contraerla es a través de las relaciones sexuales sin protección y la infidelidad por parte de la pareja. En los hombres, el parásito vive y se multiplica pero raramente causa síntomas. Por lo tanto, las mujeres con frecuencia son infectadas repetidamente por sus compañeros de relaciones sexuales, ya que no saben que ellos están infectados. La mujer puede no enterarse de que tiene tricomoniasis por días o meses debido a que el parásito puede vivir en el cuerpo de la mujer sin causar ningún síntoma. Pero luego, el parásito se multiplica repentinamente y causa síntomas muy desagradables.

Si una mujer tiene más de un compañero de relaciones sexuales, sus probabilidades de contraer tricomonosis son mucho más altas. Muy raramente, el parásito puede transmitirse a través de toallas, paños, o trajes de baño mojados.

El parásito vive en el tracto genito-urinario en su forma de trofozoito que se multiplica en un medio y pH adecuado y puede ser causante de diferentes problemas a nivel del tracto genital que puede o no afectar al neonato.

Por estos motivos deseamos establecer la prevalencia de la infección por *Trichomonas vaginalis* en mujeres embarazadas.

Metodología

La investigación está basada en la recolección de información a través de extracción de datos de los registros del laboratorio del Hospital San Roque de la ciudad de Villazón, de mujeres embarazadas. Los métodos empleados en este tipo de trabajo son:

- Método de observación
- Método parasitológico
- Método deductivo
- Método analítico
- Método empírico

Tipo y diseño general de la investigación

De acuerdo a la naturaleza del estudio se adopta el enfoque cuantitativo que es el indicado para llevar adelante la investigación, ya que se recurrirá a la recolección de datos con base en la medición numérica y el análisis estadístico.

Población

La población de análisis son pacientes maternas que asisten al laboratorio del Hospital San Roque de la ciudad de Villazón en la gestión 2010.

Criterios de inclusión

Maternas internadas en las Salas de maternidad del hospital San Roque.

Criterios de exclusión

Mujeres embarazadas que asisten al laboratorio del hospital San Roque con otro seguro como ser Seguro de la Caja Nacional.

Resultados

Es positivo si existe la presencia de Trichomonas vaginalis la cual es: más clara con un halo a su alrededor y puede o no que se observe los flagelos o alguna característica morfológica del parásito.

Es negativo porque no observé Trichomonas vaginalis solo células descamadas.

Casos	Nº De Pacientes	Porcentaje %
Positivos	89	16
Negativos	448	84
Total	537	100

Tabla 1 Positividad para tricomoniasis en mujeres embarazadas del “Hospital San Roque”. Villazón 2010

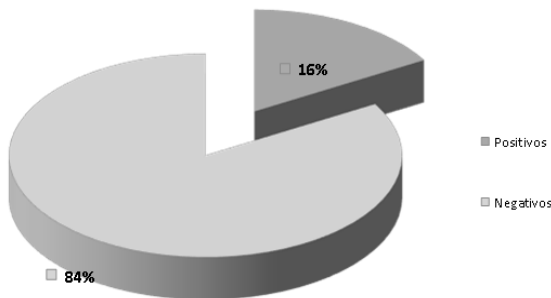


Gráfico 1 Positividad para tricomoniasis en mujeres embarazadas del Hospital San Roque Villazón

Casos/Edad	Positivos	%	Negativos	%	Total	Total %
Menor Años 15	0	0	3	0,6	3	0,6
15 – 25 Años	27	5,1	135	25,1	162	30,2
25 – 35 Años	41	7,6	209	38,9	250	46,5
Mayor Años 35	21	3,9	107	18,8	128	22,7
Total	89	16,6	448	83,4	537	100 %

Tabla 2 Casos positivos y negativos de tricomoniasis de acuerdo a la edad, en mujeres embarazadas que asisten al “Hospital San Roque”. Villazón 2010

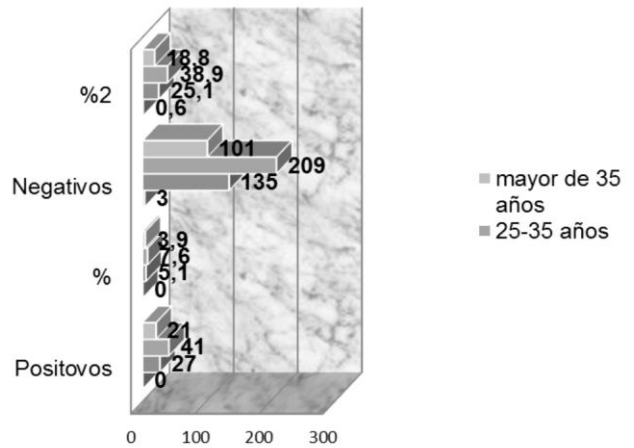


Gráfico 2 Casos positivos y negativos de tricomoniasis de acuerdo a la edad, en mujeres embarazadas que asisten al “Hospital San Roque”, Villazón 2010

Tiempo de gestación	Casos Positivos	%	Casos Negativos	%	Total	Total %
1º trimestre	54	10	201	37	255	47
2º trimestre	27	5	110	21	137	26
3º trimestre	8	2	137	25	145	27
Total	89	17	448	83	537	100%

Tabla 3 Casos positivos y negativos de tricomoniasis de acuerdo al estado de gestación, de mujeres embarazadas del “Hospital San Roque”, Villazón 2010

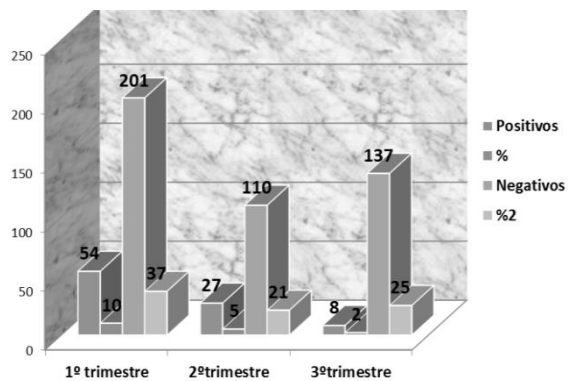


Gráfico 4 Casos positivos y negativos de tricomoniasis de acuerdo al estado de gestación de mujeres embarazadas, del “Hospital de San Roque”, Villazón 2010

Procedencia	Nº De Pacientes	%
Area Urbana	436	81
Area Dispersa	101	19
Total	537	100

Tabla 4 Mujeres embarazadas del área urbana y dispersa que asisten al “Hospital San Roque”. Villazón 2010

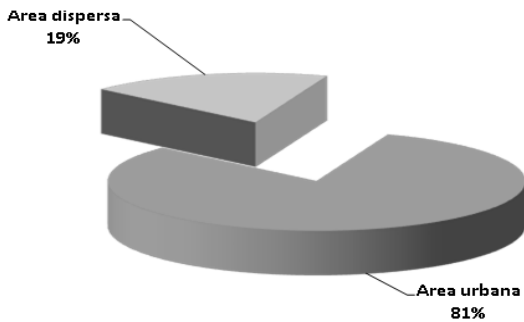


Gráfico 4 Mujeres embarazadas del área urbana y dispersa que asisten al Hospital San Roque, Villazón 2010

Control	Nº De Pacientes	%
Si Asisten	48	9
No Asisten	489	91
Total	537	100

Tabla 5 Mujeres embarazadas que realizan el control después del tratamiento, en el “Hospital San Roque”, Villazón 2010

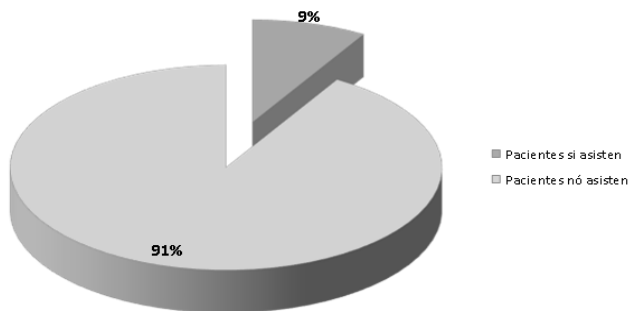


Gráfico 5 Mujeres embarazadas que realizan el control después de tratamiento, en el Hospital San Roque, Villazón 2010

Resultados

- En este trabajo de investigación se obtuvo 537 muestras que realizan el examen respectivo de flujo vaginal para el examen directo y la tinción de Gram respectivo; de las cuales 89 muestras son positivas que equivale al 16% y 448 mujeres negativas equivalente al 84%; para la enfermedad causada por Trichomonas vaginalis en mujeres embarazadas.

Mediante los resultados obtenidos en la presente investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

Sea concluido de manera satisfactoria con el objetivo general de la investigación determinada la prevalencia de infección por Trichomonas vaginalis en mujeres embarazadas que asisten al Hospital. San Roque de la ciudad de Villazón.

La hipótesis enunciada en la respuesta al problema identificado no fue verificada por que obtuvimos en la investigación un 16% valor bajo respecto del 30%.

Se llegó a la conclusión que el grupo atareo más afectado esta dentro de los 25 años a 30 años, correspondiente a un 7,6%; del total de muestras positivas (16,6%), y el 83,4% son casos negativos.

Se determino que la infección por Trichomonas vaginalis se da dentro del primer trimestre obteniendo un valor de 54 muestras equivalente al 10% del total de muestras procesadas, aunque el porcentaje de muestras negativas es del 83%.

Agradecimientos

Los investigadores agradecen a la Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología (DICYT) y a la Facultad de Ciencias tecnológicas y agrarias de la Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca por el apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo.

Referencias

Atias A., Neghme A. Parasitología Clínica. Edición 3º, Editorial: Mediterráneo Santiago; Chile 1990.

Botero D., Restrepo M. Parasitosis Humana. Edición 4º; Medellin Colombia 2003.
<http://www.gefor.4t.com/concurso/parasitologia/trichomonas03.jpg>

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001331.htm>

Sivila M. LH. Parasitología. 2000.
Trigoso C. Parasitología Básica Tomo I.
www.frebooks4doctores.com

[Título en Times New Roman y Negritas No.14]

Apellidos en Mayúsculas -1er Nombre de Autor †, Apellidos en Mayúsculas -2do Nombre de Autor

Correo institucional en Times New Roman No.10 y Cursiva

(Indicar Fecha de Envío: Mes, Día, Año); Aceptado (Indicar Fecha de Aceptación: Uso Exclusivo de ECORFAN)

Resumen

Título

Objetivos, metodología

Contribución

(150-200 palabras)

Abstract

Title

Objectives, methodology

Contribution

(150-200 words)

Keyword

Indicar (3-5) palabras clave en Times New Roman y Negritas No.11

Citación: Apellidos en Mayúsculas -1er Nombre de Autor †, Apellidos en Mayúsculas -2do Nombre de Autor. Título del Paper. Título de la Revista. 2015, 1-1: 1-11 – [Todo en Times New Roman No.10]

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Instrucciones para el autor

Introducción

Texto redactado en Times New Roman No.12, espacio sencillo.

Explicación del tema en general y explicar porque es importante.

¿Cuál es su valor agregado respecto de las demás técnicas?

Enfocar claramente cada una de sus características

Explicar con claridad el problema a solucionar y la hipótesis central.

Explicación de las secciones del artículo

Desarrollo de Secciones y Apartados del Artículo con numeración subsecuente

[Título en Times New Roman No.12, espacio sencillo y Negrita]

Desarrollo de Artículos en Times New Roman No.12, espacio sencillo.

Inclusión de Gráficos, Figuras y Tablas-Editables

En el *contenido del artículo* todo gráfico, tabla y figura debe ser editable en formatos que permitan modificar tamaño, tipo y número de letra, a efectos de edición, estas deberán estar en alta calidad, no pixeladas y deben ser notables aun reduciendo la imagen a escala.

[Indicando el título en la parte inferior con Times New Roman No.10 y Negrita]

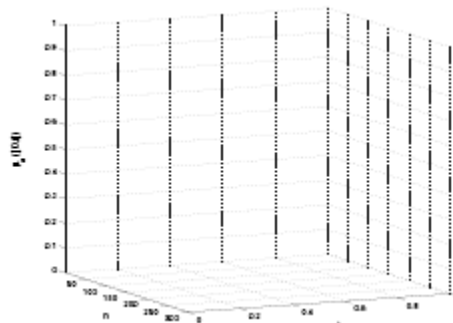


Grafico 1 Titulo y Fuente (en cursiva).

No deberán ser imágenes- todo debe ser editable.

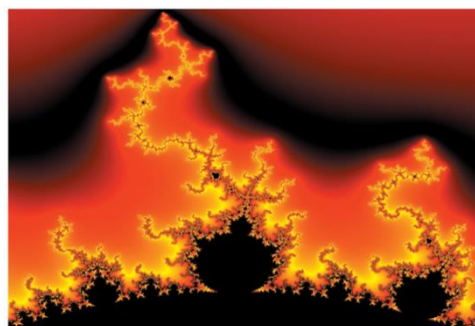


Figura 1 Titulo y Fuente (en cursiva).

No deberán ser imágenes- todo debe ser editable.

Tabla 1 Titulo y Fuente (en cursiva).

No deberán ser imágenes- todo debe ser editable.

Cada artículo deberá presentar de manera separada en **3 Carpetas**: a) Figuras, b) Gráficos y c) Tablas en formato .JPG, indicando el número en Negrita y el Titulo secuencial.

Instrucciones para el autor

Para el uso de Ecuaciones, señalar de la siguiente forma:

$$Y_{ij} = \alpha + \sum_{h=1}^r \beta_h X_{hij} + u_j + e_{ij} \quad (1)$$

Deberán ser editables y con numeración alineada en el extremo derecho.

Metodología a desarrollar

Dar el significado de las variables en redacción lineal y es importante la comparación de los criterios usados

Resultados

Los resultados deberán ser por sección del artículo.

Anexos

Tablas y fuentes adecuadas.

Agradecimiento

Indicar si fueron financiados por alguna Institución, Universidad o Empresa.

Conclusiones

Explicar con claridad los resultados obtenidos y las posibilidades de mejora.

Referencias

Utilizar sistema APA. **No** deben estar numerados, tampoco con viñetas, sin embargo

en caso necesario de numerar será porque se hace referencia o mención en alguna parte del artículo.

Ficha Técnica

Cada artículo deberá presentar un documento Word (.docx):

Nombre de la Revista

Título del Artículo

Abstract

Keywords

Secciones del Artículo, por ejemplo:

1. *Introducción*
2. *Descripción del método*
3. *Análisis a partir de la regresión por curva de demanda*
4. *Resultados*
5. *Agradecimiento*
6. *Conclusiones*
7. *Referencias*

Nombre de Autor (es)

Correo Electrónico de Correspondencia al Autor

Referencia

Formato de Originalidad



Sucre, Chuquisaca a ____ de ____ del 20 ____

Entiendo y acepto que los resultados de la dictaminación son inapelables por lo que deberán firmar los autores antes de iniciar el proceso de revisión por pares con la reivindicación de ORIGINALIDAD de la siguiente Obra.

Artículo (Article):

Firma (Signature):

Nombre (Name)

Formato de Autorización



Sucre, Chuquisaca a ____ de ____ del 20 ____

Entiendo y acepto que los resultados de la dictaminación son inapelables. En caso de ser aceptado para su publicación, autorizo a ECORFAN-Bolivia a difundir mi trabajo en las redes electrónicas, reimpresiones, colecciones de artículos, antologías y cualquier otro medio utilizado por él para alcanzar un mayor auditorio.

I understand and accept that the results of evaluation are inappealable. If my article is accepted for publication, I authorize ECORFAN-Bolivia to reproduce it in electronic data bases, reprints, anthologies or any other media in order to reach a wider audience.

Artículo (Article):

Firma (Signature)

Nombre (Name)

Revista de Ciencias de la Salud

“Daño genotóxico en mujeres de la población de Taxco de Alarcón Guerrero”

SALAS, Vanessa, LÓPEZ-Jenny, VÁZQUEZ, Analinne, TALAVERA, Oscar, MORENO, Elena

“El polimorfismo Q192R de la Paraoxonasa 1 como modulador del efecto oxidativo del plaguicida Metamidofos en células mononucleares de sangre periférica”

RAMÍREZ, Marco, HUERTA, Gerardo, FLORES, Eugenia MORENO, Elena

“La exposición a Metamidofos altera la expresión de p53 en células MCF-10^a”

SERAFIN, Jesus, OLEA, Monserrat, ANTONIO, Verónica, MORENO, Elena

“Prevalencia de trichomonas vaginales en mujeres embarazadas que asisten al laboratorio del Hospital San Roque Villazón”

LEZ, Alvino, MAMANI, Marice

Universidad Mayor Real San Francisco Xavier de Chuquisaca.

