



UNIVERSIDAD MICHOCANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Tesis

**"Exposición a Ocratoxina A en una población de
pacientes ambulatorios del Hospital de la Mujer"**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A

Licenciada en Nutrición
Sara Alejandra Díaz Tena

Dirección de Tesis:
Virginia Angélica Robinson Fuentes Ph.D.



Morelia, Michoacán
México
Julio 2017

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo aprobó la tesis presentada por:

Licenciada en Nutrición SARA ALEJANDRA DÍAZ TENA

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Edith Higareda Mendoza

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias Químicas y Biológicas

Martha Eva Viveros Sandoval

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctor en Ciencias, especialidad en Biotecnología

Héctor Martínez Flores

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctora en Ciencias Biológicas

Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Esta tesis fue realizada en el programa de posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Acreditado en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad - CONACYT
Como programa consolidado

La autora de esta tesis, estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, agradece a CONACYT la beca que le fue otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias de la Salud (Registro de becario: 572160) y la Beca Mixta de Movilidad en el Extranjero del programa CONACYT de Becas de Inversión en el Conocimiento 2016-Marzo 2017, otorgada para la realización de la estancia en la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia (01 de septiembre a 01 de noviembre 2016).

La presente investigación se realizó en:
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas
“Dr. Ignacio Chávez”
División de estudios de Posgrado
Laboratorio de Desarrollo analítico
Morelia, Michoacán, México

La etapa de muestreo se llevó a cabo en:
Hospital de la Mujer, Michoacán
Laboratorio Clínico
Morelia, Michoacán, México

Algunas de las determinaciones de ocratoxina A se realizaron en:
Universidad Industrial de Santander
Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas (CROM-MASS)
Bucaramanga, Santander, Colombia

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi Directora de Tesis y a todo mi Comité tutorial por el tiempo que me dedicaron, sus consejos y el aporte de su conocimiento a mi trabajo, ha sido invaluable.

A la Dra. Virginia Robinson, gracias, por su apoyo y disponibilidad, por su infinita paciencia y por el impulso que me brindó para llevar a cabo mi proyecto de investigación. Por enseñarme que las personas positivas encuentran las maneras no las excusas.

Agradecer al Hospital de la Mujer de Morelia, por permitirme utilizar su campo clínico, al personal del Laboratorio por su colaboración con la toma de muestras, fue un alivio, y especialmente, al Dr. Llanos y al Dr. Reyes, por su interés y disposición que permitieron se concretase este trabajo.

Agradecer también, a la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia; por haberme dado la oportunidad de realizar una pasantía en su campus, y que bajo el asesoramiento de la Dra. Elena Stashenko, Directora del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de masas (CROM-MASS) de la Universidad, y de la Química Deyanira Caballero, Subdirectora del Departamento de Calidad del mismo laboratorio, me fue posible cumplir con los objetivos de mi estadía que complementaron y enriquecieron mi proyecto.

A todas las pacientes voluntarias, gracias, por su participación y confianza. Sin ellas esta tesis no existiría.

Y por último a mis compañeros del Laboratorio de Desarrollo Analítico: Miriam, Karen, Lilia, Christian, Pablo, Wilmer, Nayib; porque han conseguido que lo difícil fuese fácil, hicieron del laboratorio un lugar en el que siempre disfruté trabajar.

DEDICATORIA

A mis padres:

En ustedes tengo un espejo donde reflejarme y unos pilares sólidos donde sostenerme. Gracias por estar siempre ahí con su amor y apoyo incondicional.

A mis hermanas:

Patricia (pollito) y Julieta, por ser mis cómplices, confidentes y amigas, siempre.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- ANTECEDENTES	4
2.1.- OCRATOXINA A	4
2.1.1.- Descripción	4
2.1.2.- Características químicas de la OTA	4
2.2.- PRODUCCIÓN DE OTA	5
2.3.- OTA EN ALIMENTOS	6
2.3.1.- Contaminación de alimentos por OTA	6
2.3.2.- Contaminación de alimentos mexicanos por OTA	7
2.4.- FORMAS DE EXPOSICIÓN A OTA.....	8
2.5.- TOXICIDAD DE LA OTA.....	9
2.5.1.- Toxicidad aguda.....	9
2.5.2.- Toxicidad crónica.....	10
2.5.3.- Toxicocinética.....	12
2.5.4.- Toxicodinamia	13
2.5.5.- Sinergismo y aditividad	15
2.5.6.- Interacción de OTA con nutrimentos	16
2.6.- LEGISLACIÓN DE LA OTA.....	17
2.6.1.- Legislación de concentraciones de OTA en productos alimenticios.....	17
2.6.2.- Legislación en la ingesta humana de OTA.....	18
2.7.- DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OTA	20
2.7.1.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	20
2.7.2.- Espectrometría de masas (MS).....	21
2.7.3.- Inmunoensayos (ELISA).....	22
2.8.- EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN HUMANA A OTA	23
2.8.1.- Estimación de la ingesta a partir de concentraciones conocidas de OTA en alimentos	24

2.8.2.- Estimación de la ingesta a partir de matrices biológicas	24
3.- JUSTIFICACIÓN	25
4.- HIPÓTESIS	26
5.- OBJETIVOS	27
5.1.- OBJETIVO GENERAL	28
5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6.- MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1.- DISEÑO DE ESTUDIO	29
6.2.- POBLACIÓN DE ESTUDIO	29
6.3.- CRITERIOS DE SELECCIÓN	29
6.3.1.- Inclusión	29
6.3.2.- Exclusión	29
6.3.3.- Eliminación	29
6.4.- CÁLCULO DE LA MUESTRA	29
6.5.- TIPO DE MUESTREO	31
6.6.- CONSIDERACIONES ÉTICAS	31
6.7.- VARIABLES	32
6.8.- INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN	33
6.8.1.- Cuestionario de Antecedentes Médicos	33
6.8.2.- Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos (CFCA)	33
6.8.3.- Antropometría	33
6.9.- PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO	35
6.9.1.- Etapa de muestreo	35
6.9.2.- Tratamiento de la muestra sanguínea	36
6.9.3.- Análisis de las muestras	37
7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
8.- RESULTADOS	43
8.1.- RETENCIÓN DE LA MUESTRA	43
8.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA	43
8.3.- INDICADORES DIETÉTICOS	45
8.4.- CONCENTRACIONES DE OTA EN SUERO SANGUÍNEO	49

8.4.1.- Determinación de OTA en suero sanguíneo por método de ELISA	49
8.4.2.- Determinación de OTA en suero sanguíneo por método HPLC MS	49
8.5.- ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A OTA MEDIANTE EL CÁLCULO DE	
INGESTA DIARIA CONTINUA (IDC)	57
8.5.1.- IDC a partir de concentraciones de OTA conocidas en alimentos	57
8.5.2.- IDC a partir del cálculo con fórmula de Klassen.....	58
8.6.- INGESTA DIARIA TOLERABLE (IDT).....	58
9.- DISCUSIÓN.....	60
10.- CONCLUSIONES	69
11.- PERSPECTIVAS.....	70
12.- REFERENCIAS	71
 III. ANEXOS	 79
ANEXO 1. CARTA DE ACEPTACIÓN DEL HOSPITAL DE LA MUJER MICHOACÁN	80
ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO	81
ANEXO 3. CUESTIONARIO DE ANTECEDENTES MÉDICOS.....	83
ANEXO 4. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales ocratoxinas y análogos	4
Tabla 2. Alimentos contaminados por OTA reportados en México	8
Tabla 3. Concentración promedio por grupos de muestras de maíz	8
Tabla 4. Los límites máximos de contenido de OTA en productos alimenticios para alimentación animal. Reglamento (CE) 576/2006.....	18
Tabla 5. Los límites máximos de contenido de OTA en productos alimenticios para Consumo humano. Reglamento (CE) 1881/2006 y posteriores modificacio- nes (105/2010 y 594/2012).	19
Tabla 6. Estudios con mayor y menor prevalencia de OTA en sangre.....	30
Tabla 7. Descripción de las variables de estudio	32
Tabla 8. Clasificación de IMC de acuerdo a la OMS (1997).....	35
Tabla 9. Valores de OTA en estándares y en suero* (Helica: Quantitative Assay for OTA in Human and Animal Serum and Milk Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	39
Tabla 10. Características del patrón de OTA	40
Tabla 11. Pruebas no paramétricas utilizadas	42
Tabla 12. Lugar de origen de las participantes	44
Tabla 13. Antecedentes patológicos personales	45
Tabla 14. Diagnóstico de IMC de la población	46
Tabla 15. Ingesta de vitaminas y minerales en la población	48
Tabla 16. Ingesta de AGPIs en la población	48
Tabla 17. Concentraciones de OTA en suero	50
Tabla 18. Concentraciones de OTA en suero de acuerdo al estado clínico y grupo de edad	51
Tabla 19. Muestras analizadas por ambos métodos	52
Tabla 20. Estándares de OTA para curva de calibración	53
Tabla 21. Comparativa entre métodos	56
Tabla 22. Diferencias entre métodos (Prueba estadística de Wilcoxon)	56
Tabla 23. Estimación de IDC a partir de concentraciones conocidas de OTA en alimentos de Morelia, Mich	57

Tabla 24. Comparativa entre IDC (por ambas fórmulas) e IDT	59
Tabla 25. Diferencias entre fórmulas para IDC y % IDT	59
Tabla 26. Relación entre concentración de OTA en suero y consumo de tortilla	60
Tabla 27. Estudios sobre detección de OTA en sangre realizados en última década en distintos países	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la ocratoxina A	5
Figura 2. Reporte de la European Food Safety Authority (EFSA) 2006 de alimentos contaminados con OTA en 16 países europeos	7
Figura 3. Formas de exposición a OTA a través de alimentos	10
Figura 4. Metabolismo de la ocratoxina A	13
Figura 5. Proceso de inhibición de la síntesis de proteínas por OTA	16
Figura 6. Esquema de un espectrofotómetro de masas	22
Figura 7. Tipos de ELISA	23
Figura 8. Diagrama de flujo para el muestreo de las mujeres	37
Figura 9. Distribución de consumo de macronutrientes	46
Figura 10. Distribución de macronutrientes por grupos de alimentos	47
Figura 11. Cromatograma de patrón de OTA a concentración de 19ppb	53
Figura 12. Espectro de masas (m/z) de patrón de OTA a concentración de 19ppb	54
Figura 13. Cromatograma positivo a OTA de muestra SA106	54
Figura 14. Espectro de masas (m/z) positivo a OTA de muestra SA106.....	55

I. RESUMEN

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* principalmente. Contamina una gran variedad de alimentos de consumo humano: cereales, café, cerveza, vino, etc. La OTA está clasificada como “posiblemente cancerígeno para el ser humano” (grupo 2B según IACR). Su toxicidad ha sido descrita en estudios con animales y en seres humanos concluyendo que posee propiedades carcinogénicas, mutagénicas, teratogénicas, nefrotóxicas, hepatotóxicas e inmunotóxicas. Los métodos más utilizados para determinar OTA son: HPLC acoplada a espectrometría de masas (MS/MS) e inmunoensayos (ELISA). Objetivo general: Estimar la exposición a OTA en una población de pacientes ambulatorias del Hospital de la Mujer, mediante el análisis de indicadores dietéticos y de concentraciones en suero sanguíneo. Material y Métodos: Se incluyeron mujeres entre 18 y 60 años de edad, no embarazadas. Contestaron un Cuestionario de Antecedentes Médicos y un Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos, se les tomó peso y talla, y se les extrajeron 2.5ml de muestra sanguínea para su posterior análisis por ELISA y HPLC MS/MS. Resultados: Tamaño de muestra: 153 pacientes, promedio de edad de 34 años, con un peso y talla promedio de: 67.5kg y 1.59m respectivamente, IMC poblacional de 26.6 kg/m². que corresponde a sobrepeso. El consumo promedio de Energía fue de: 1724kcal/día de las cuales el 68% la aportan los hidratos de carbono. El cereal de mayor consumo es el maíz, específicamente la tortilla. Las Ingestas diarias recomendadas (IDR) se cumplen en la mayoría de vitaminas y minerales con excepción de la vitamina C y E. El consumo de ácidos grasos Omega 3 y 6 también resultó inferior a la IDR. La ingesta diaria continua de OTA se calculó por dos métodos: fórmula de Klassen resultando 5.1ng/kg pc/día y por concentración de OTA en alimentos resultando 13.2ng/kg pc/día, por lo tanto se rebasa el límite de IDT que establece la FAO/OMS. En las determinaciones de OTA por ELISA resultó: 86% de muestras positivas con una concentración promedio de 2.6143 ng/mL. Por HPLC MS/MS se analizaron 50 muestras que ya habían sido determinadas por ELISA, de las cuales 54% resultaron positivas con una concentración promedio de 0.9715 ng/mL.

Conclusión: La población de pacientes ambulatorios del Hospital de la Mujer se encuentra expuesta a OTA y la ingesta diaria continua de la población rebasa los límites permitidos de Ingesta Diaria Tolerable.

Palabras Clave: Ocratoxina A, exposición humana, suero sanguíneo, ELISA, HPLC MS.

II. ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by some strains of *Aspergillus* and *Penicillium* molds that contaminate a great variety of food commodities like cereals, coffee, beer, wine, etc. OTA is a potential risk for human health. OTA is classified as “possible carcinogen for human beings” (group 2B according to IACR). OTA, very well describe as a carcinogenic, mutagenic, terathogenic mycotoxin, has been also related to endemic nephropathy and to hepatic and immunopathies. The most popular methods for OTA determination and quantification are: HPLC mass spectrometry (HPLC MS) and immunoassay (ELISA). Objective: To estimate the OTA exposition in a population of ambulatory patients from the Woman Hospital of Morelia, Mexico, using diet and biochemical markers. Materials and Methods: women between 18 and 60 years old, non pregnant; who answered a medical and a frequent food consumption questionnaires. Weight and height measurements were also taken. Finally, a blood sample of 2.5ml was extracted for analysis by ELISA and HPLC MS. Results: total sample: 153 patients, average age: 34 years old, average weight and height: 67.5kg and 1.59m respectively, average IMC 26.6 kg/m². That corresponds to overweight. The energy consumption was: 1724kcal/day, 68% of them from carbohydrates. Maize is the cereal with the highest consumption, specifically tortilla. The daily intake requirements (DIR) were accomplished in the majority of the vitamins and minerals with the exception of vitamin C and E. The consumption of omega 3 and omega 6 fatty acids was also inferior to DIR. The average intake of OTA was calculated by two different methods: Klassen formula with a result of: 5.1ng/kg bw/day, and by OTA concentration in food commodities with a result of: 13.2ng/kg bw/day, although the IDT is superior from the one that establishes the FAO/OMS. In the ELISA determinations there were an 86% of positive samples with an OTA average concentration of 2.6143 ng/mL. By HPLC MS, 50 samples that had already been determinate by ELISA were analyzed, resulting 54% positive for OTA with an average concentration of 0.9715 ng/mL.

Conclusion: The outpatient population of the Women's Hospital is exposed to OTA and the continuous daily intake of the population exceeds the limits of the Permissible Tolerable Daily Intake.

Key words: Ochratoxin A, human exposure, blood serum, ELISA, HPLC MS.

1.- INTRODUCCION

Las micotoxinas del griego mukes (hongo) y del latín toxicum (tóxico-veneno) son sustancias tóxicas producidas por ciertos géneros y especies de hongos capaces de crecer sobre una amplia gama de productos orgánicos (Ravelo *et al.*, 2011). Nos referimos a las micotoxinas como metabolitos secundarios ya que no son necesarias para el crecimiento o desarrollo fúngico; es decir, la presencia del hongo no significa forzosamente la presencia de micotoxinas; para su producción se requiere de la interacción de factores como la humedad, la temperatura, el pH y la composición del sustrato (Arbillaga *et al.*, 2004).

La exposición a las micotoxinas a través de los alimentos representan un riesgo para la salud de los animales y seres humanos que las consumen (Pineda *et al.*, 2012). Su toxicidad puede variar desde el desencadenamiento de actividades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas hasta la inmunosupresión y el desarrollo de desórdenes de tipo hormonal (dependiendo de la micotoxina considerada) (Arbillaga *et al.*, 2004; Haighton *et al.*, 2012).

En la actualidad se han estudiado alrededor de 400 variedades de micotoxinas, siendo las aflatoxinas, la ocratoxina A, la zearalenona, las fumonisinas y los tricotecenos las principales asociadas a toxicidad alimentaria (Duarte *et al.*, 2009).

La ocratoxina A ha tomado importancia en los últimos años debido a que es un agente nefrotóxico conocido, y la exposición a este ha demostrado la formación de tumores renales, entre otros efectos dañinos, en animales de experimentación (Jayatilake *et al.*, 2013; Pineda *et al.*, 2012). En seres humanos los estudios sobre la toxicidad de la ocratoxina A no han sido concluyentes, sin embargo existe evidencia clara de la exposición que tenemos a ella como consecuencia de nuestros patrones de consumo de alimentos (Shephard, 2008).

2.- ANTECEDENTES

2.1.- OCRATOXINA A

2.1.1.- Descripción

La ocratoxina A (OTA) fue identificada por Van der Merwe en 1965 en el transcurso de una investigación donde se estudiaba la toxicidad de hongos aislados a partir de diferentes cereales y legumbres provenientes de Sudáfrica (Leiko *et al.*, 2005). A partir de estos hongos se posibilitó la caracterización de un metabolito secundario el cual se denominó ocratoxina (Creppy, 2002; Shephard, 2008). Estudios posteriores identificaron diferentes tipos de ocratoxinas (**Tabla 1**); siendo la OTA la que se encuentra más frecuentemente de forma natural y la más tóxica (López de Cerain *et al.*, 2000; Leiko *et al.* 2005).

Tabla 1. Principales ocratoxinas y análogos (Soriano, 2007)

OCRATOXINAS	R1	R2	R3
Ocratoxina A	A	Cl	H
Ocratoxina B	B	H	H
Ocratoxina C	C	Cl	H
Ocratoxina α	OH	Cl	H
Ocratoxina β	OH	H	H

A. $C_6H_5CH_2CH(COOH)NH-$ B. $C_6H_5CH_2CH(COOEt)NH-$

C. $C_6H_5CH_2CH(COOMe)NH-$

2.1.2.- Características químicas de la OTA:

La molécula está formada por un anillo de isocumarina unido a través de un enlace tipo amida con una molécula de fenilalanina. Químicamente es N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1-H-2-benzopirano-7-il)carbonil]-L-fenilalanina (**Figura 1**) (Ravelo *et al.*, 2011).

Su peso molecular es: 404 g/mol^{-1} , Fluorece azul verdoso al ser excitada con luz ultravioleta UV máximo 215 y 334 nm, pKa 4.4 (Alexander *et al.*, 2015). Es incolora, soluble en disolventes orgánicos polares, poco soluble en agua y con características de ácido débil. Presenta una alta estabilidad mostrando gran resistencia a elevadas temperaturas y a pH ácido (Ravelo *et al.*, 2011). Estable a temperaturas mayores de 180°C (Alexander *et*

al., 2015). Por lo tanto suelen resistir la mayoría los procesos de esterilización y elaboración de alimentos, como el hervido, el tostado, el horneado, el freído y la fermentación (Ostry *et al.*, 2013). Todas estas características químicas son de suma importancia para su detección por métodos cromatográficos y espectrofotométricos.

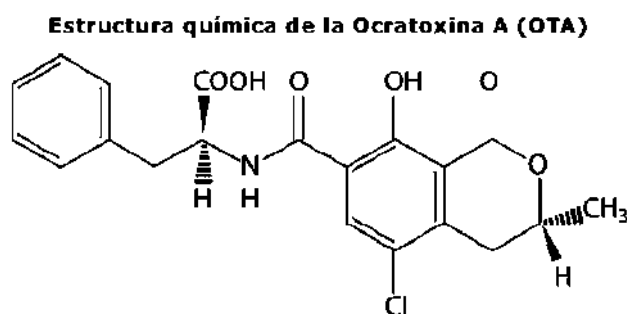


Figura 1. Estructura de la Ocratoxina A (Ravelo *et al.*, 2011).

2.2.- PRODUCCIÓN DE OTA

Para fines biológicos, la OTA es una micotoxina resultante del metabolismo secundario de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* principalmente (López de Cerain *et al.*, 2000). Éstos hongos se consideran los principales productores de OTA en alimentos debido a su gran facilidad de dispersión y crecimiento (Pérez de Obanos *et al.*, 2001).

Aspergillus crece en un intervalo de temperatura comprendido entre 12-37 °C, y se asocia a climas cálidos y tropicales, detectándose sobre todo en alimentos almacenados (López de Cerain *et al.*, 2000).

Penicillium crece en un intervalo de temperatura más bajo entre 4-31 °C, por lo que contamina alimentos producidos en climas templados y fríos, especialmente cereales y derivados (López de Cerain *et al.*, 2000).

Los valores mínimos de actividad de agua necesarios para que estos hongos puedan producir OTA están en el intervalo 0.83-0.9 a 24° C (Pérez de Obanos *et al.*, 2001). Los valores de actividad de agua óptimos se sitúan entre 0.95-0.99 (Hans *et al.*, 2007).

Las especies *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum* y *P. viricatum* se caracterizan por tener un alto potencial ocratoxigénico (Shephard, 2008; Hans *et al.*, 2007).

Las prácticas agrícolas, las condiciones medio-ambientales, el almacenamiento y el transporte, promueven la presencia de OTA en los alimentos (Alexander *et al.*, 2015).

En la literatura se ha reportado que los hongos productores de ocratoxinas, se desarrollan con mayor frecuencia durante el almacenamiento cuando se lleva a cabo en condiciones inadecuadas (Shephard, 2008; Hans *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2009), sin embargo, también son capaces de crecer en las etapas de cultivo, manejo y transporte de alimentos.

2.3.- OTA EN ALIMENTOS

La FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) estima que de los 2,527 millones de toneladas de granos que se producen a nivel mundial (cifra de 2015) un 25% se encuentra contaminado por micotoxinas. Esta cifra es alarmante debido a que el consumo de cereales y derivados representan el grupo de alimentos de mayor consumo humano, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde una persona ingiere un promedio de 300g de cereal al día (Shephard, 2008), por lo tanto, la suma de la ingesta total de micotoxinas en una dieta rica en cereales aunada al consumo de productos de origen animal contaminados, representa una exposición considerable del ser humano a micotoxinas y probablemente a OTA.

2.3.1.- Contaminación de alimentos por OTA

La OTA se ha encontrado en una amplia gama de alimentos de importancia nutrimental y económica.

Los cereales representan una de las principales fuentes de exposición alimentaria a OTA (Tittlemier *et al.*, 2011), aunque también pueden encontrarse concentraciones importantes de contaminación en otros alimentos como en: café, productos cárnicos, cerveza, vino, té, frutos secos y especias (Turcotte *et al.*, 2013; Haighton *et al.*, 2012; Keller *et al.*, 2012).

Se estima que la ingesta diaria de OTA en humanos se encuentra entre 0.7 y 4.7 nanogramos por kilogramo de peso corporal, de esta, cerca del 50% es atribuida al consumo de cereales y sus productos derivados (Méndez-Albores y Moreno, 2009).

El panorama mundial en relación a la presencia de ocratoxina A en alimentos se centra en países europeos y Asia occidental (Bellver *et al.*, 2014). En Latinoamérica únicamente en Costa Rica, Chile, Panamá, Brasil y Argentina se han realizado estudios por la importancia económica de productos de exportación como el vino y el café (Quintana *et al.*, 2007; Dutra *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2005; Drunday y Pacin, 2013; Franco *et al.*, 2013). La mayoría de

estos productos tienen un control de calidad exhaustivo y por lo tanto cumplen con la normativa internacional.

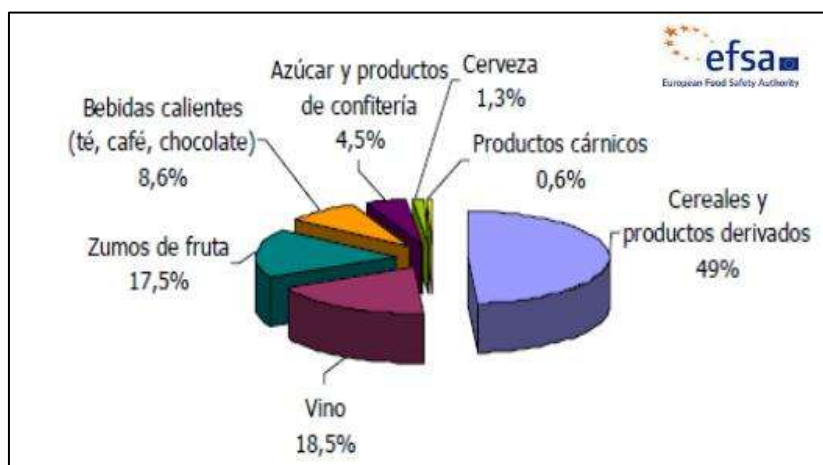


Figura 2. Reporte de la European Food Safety Authority (EFSA) 2006 de alimentos contaminados con OTA en 16 países europeos.

2.3.2.- Contaminación de alimentos mexicanos por OTA

En nuestro país existen estudios que reportan presencia de OTA y otras micotoxinas en alimentos de uso pecuario, café, maíz, trigo y cacahuate (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Robledo *et al.*, 2001; Sierra, 2004; Espinosa *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2013).

Los resultados de estos estudios concluyen que al menos un 50% de las muestras analizadas presentaban alguna cantidad detectable de micotoxinas y específicamente de OTA, se destaca como la micotoxina de mayor incidencia en la mayoría de los estudios con hasta un 60% de muestras contaminadas con concentraciones por arriba de lo establecido en la normativa para alimento animal (**Tabla 2**).

En Michoacán, existe un trabajo reciente (Castillo y Robinson, 2016) en el que se muestrearon diversos alimentos de elevado consumo en la población: productos de maíz, café y cerveza. Como resultado se reportó un 100% de las muestras con concentraciones detectables de OTA, y aunque en café y cerveza no se excedían los límites permitidos por la Unión Europea (U.E); en los productos de maíz sí los rebasaron considerablemente (**Tabla 3**).

Tabla 2. Alimentos contaminados por OTA reportados en México

Alimento	Estado	Rango (µg/kg)*	Ocurrencia*	% que excedió los límites*
Maíz forrajero	Jalisco	1-352	14/35	57
Granos de uso pecuario	México en general	2-77	60/92	11.6
sorgo	Chiapas	1-353	15/45	60
Maíz (Zea mays)	Nayarit	7-122	32/49	6.2
Granos verdes de café	Nayarit	1-90	17/43	0
Trigo	Chiapas	ND*	0/12	0
Cacahuete	Chiapas	2-110	54/83	3.7

* Rango (µg de OTA por kg de producto)

*Ocurrencia: muestras detectadas con OTA / total de muestras

* % Porcentaje de muestras detectadas con OTA que excedieron los límites establecidos

*ND: no se detectó OTA

Tabla 3. Concentración promedio por grupos de muestras de maíz (Castillo y Robinson 2016)

PRODUCTO	N° de MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE DE CONTAMINACION	CONTAMINACIÓN			LIMITE PERMITIDO POR LA U.E (µg/kg)
			PROMEDIO (µg/kg)	MINIMO (µg/kg)	MAXIMO (µg/kg)	
GRANOS DE MAÍZ	18	100.00%	3.415	2.732	4.163	5
CEREALES PARA EL DESAYUNO	4	100.00%	3.509	3.197	3.696	3
FRITURAS DE MAÍZ	7	100.00%	3.219	2.991	6.51	3
HARINAS DE MAÍZ	2	100.00%	3.381	2.989	3.44	3

2.4.- FORMAS DE EXPOSICIÓN A OTA

Existen dos formas de exposición humana a OTA a través del consumo de alimentos (Figura 3):

1. Forma directa: plantas y cosechas son contaminadas con hongos ocratoxinogénicos. Hay producción de OTA que llega a la matriz y que posteriormente es consumida por las personas (Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007). Ésta vía es la más frecuente debido a la variedad de sustratos vegetales

para consumo humano y al gran porcentaje de ingesta que estos representan en la dieta de la población (Drejer *et al.*, 2014).

2. Forma indirecta mediante el consumo de productos de origen animal: el animal es alimentado con pienso y forrajes que fueron contaminados por hongos ocratoxinógenos. La OTA producida ingresa al organismo y se distribuye en los tejidos animales (músculo, vísceras, grasa, sangre) que posteriormente llegan a la mesa de los consumidores (Pfohl-Leszkowicz y Manderville, 2007; Coronel, 2012). La carne bovina, en principio, no supone peligro para la salud ya que los rumiantes destruyen la OTA por la acción de enzimas bacterianas presentes en su sistema digestivo, lo que evita que la toxina se acumule en los tejidos (Gauchi y Leblanc, 2002; Coronel, 2012). Por el contrario, los alimentos derivados del pollo y cerdo, representan una fuente potencial de transmisión de la toxina a la población humana (Brewer *et al.*, 2013).

Por último, existe otro tipo de forma indirecta descrita en la literatura, y es la transmisión de OTA a través de la leche materna. Se encontró por primera vez en calostro de vacas (Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993) y posteriormente estudios realizados en países como Suecia, Canadá, Iran y Sierra Leona revelaron presencia de OTA en muestras de leche materna humana (Micco *et al.*, 1991; Jonsyn *et al.*, 1995; Scott, 2005; Dehgham *et al.*, 2014). Esta forma de exposición es preocupante ya que el recién nacido queda expuesto a los efectos dañinos de la OTA tanto a corto plazo, afectándolo de manera directa en su crecimiento y desarrollo, como a largo plazo por acumulación (Scott 2005).

2.5.- TOXICIDAD DE LA OTA

2.5.1.- Toxicidad aguda

La OTA puede causar severos efectos adversos ó incluso letalidad al administrar por vía oral una dosis única elevada (Šegvić *et al.*, 2013).

Intoxicaciones agudas por OTA (ocratoxicosis) se han reportado en animales y seres humanos con manifestaciones tales como: pérdida de peso, poliuria, polidipsia, hemorragias multifocales y formación de trombos de fibrina en bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón, así como nefrosis y necrosis hepática (Studer-Rohr *et al.*, 2000).

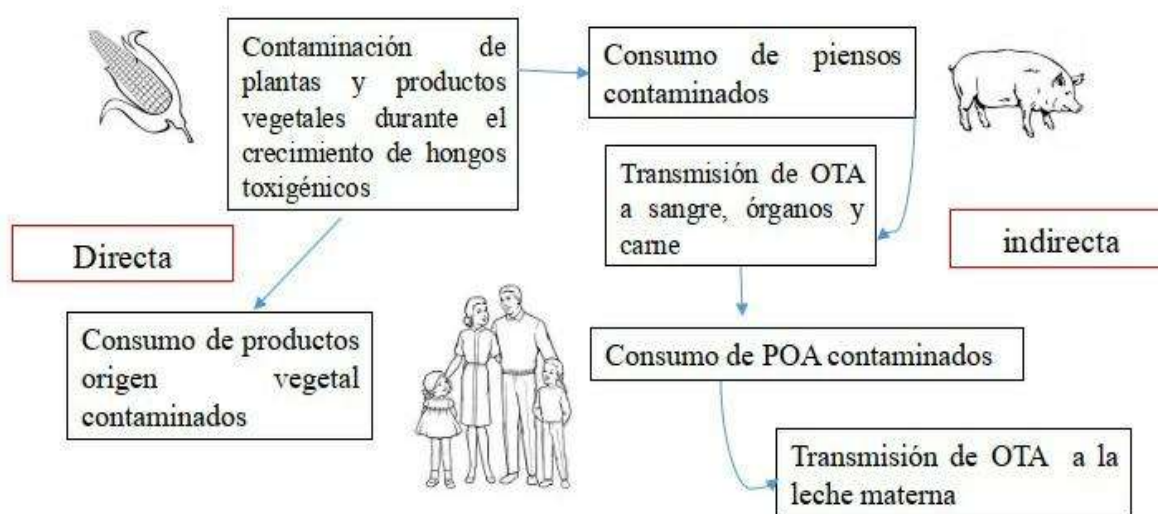


Figura 3. Formas de exposición a OTA a través de alimentos

En humanos las ocratoxicosis, son poco frecuente (sólo se han reportados algunos casos en África Subsahariana) (Shephard, 2008). En animales se han determinado intervalos de DL50 entre 20-50 mg/kg en ratas y ratones, y 0.2-1 mg/kg en perros, cerdos y pollos que son las especies más sensibles a OTA (López de Cerain *et al.*, 2000).

2.5.2.- Toxicidad crónica

Es la capacidad de la OTA a causar efectos tóxicos acumulativos (Šegvić *et al.*, 2013). Esta última la más relevante por su potencial mutagénico, teratógeno, hepatotóxico, nefrotóxico e inmunotóxico (Felizardo *et al.*, 2013; Xiao *et al.*, 2006; Czakai *et al.*, 2011).

La OTA está clasificada por La Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC, 1993) como posible carcinógeno humano (grupo 2B de sustancias) (Xiao *et al.*, 2006) ya que existe suficiente evidencia en animales de la nefrotoxicidad (como la Nefropatía endémica porcina) y carcinogenicidad (desarrollo de tumores renales y de vías urinarias en ratas) de la OTA (Creppy, 2002; Kuiper-Goodman *et al.*, 2010; Mantle *et al.*, 2015).

En seres humanos los estudios que relacionan la exposición a OTA y el cáncer no han sido concluyentes (Fahmy *et al.*, 2014; Kuiper-Goodman *et al.*, 2010), sin embargo existen datos epidemiológicos que sitúan a la OTA como factor determinante para el desarrollo de diversas patologías, ejemplo de ello es “Nefropatía endémica de los Balcanes” (BEN), una

forma de insuficiencia renal crónica que presenta gran incidencia en regiones del sudeste de Europa fundamentalmente en poblaciones rurales de Bulgaria, Rumanía, Croacia, Serbia, Bosnia y Eslovenia (Yordanova *et al.*, 2010; Reljic *et al.*, 2014; Castegnaro *et al.*, 1988).

Anteriormente ésta nefropatía estaba relacionada con virus, carencias nutricionales, bacterias, metales tóxicos, sin que ninguna de esas causas resultara convincente. Fue en 1956, cuando el Dr. Arthur Grollman y colaboradores analizaron muestras de tejido renal de pacientes afectados con ésta enfermedad y encontraron dos componentes vegetales: ocratoxina A y ácido aristolóquico característicos de esta nefropatía ya que no la encontraron en otras muestras de personas con otras formas de insuficiencia renal (Petkova-Bocharova *et al.*, 1988; Peraica *et al.*, 2010, Castegnaro *et al.*, 1988).

La BEN se manifiesta en el hombre de manera muy similar a la observada en la nefropatía porcina. Se trata de una insuficiencia crónica terminal, que afecta a la población de entre 30 y 60 años, más frecuente en el sexo femenino que en el masculino y progresa hasta la muerte (Petkova-Bocharova *et al.*, 1988). Histológicamente se caracteriza por degeneración tubular, fibrosis intersticial e hialinización del glomérulo, especialmente de la corteza renal (Reljic *et al.*, 2014).

La descripción de la fisiopatología de la lesión renal, es aparentemente inespecífica, por ello es conveniente que ante la sospecha de de BEN se incorpore en las rutinas de laboratorio, la búsqueda de residuos de OTA.

Por otro lado, la exposición a OTA también representa riesgo teratogénesis en mamíferos dado que puede atravesar la placenta y acumularse en tejido fetal (Minervini *et al.*, 2013), causando anomalías morfológicas en conejos, pollos y ratones cuyas madres fueron expuestas a dosis elevadas de OTA por vía oral (Biró *et al.*, 2002; Mantle *et al.*, 2015).

Lo estudios epidemiológicos con mujeres embarazadas concluyen que en general, ni la mujer ni el producto, están bajo alto riesgo de toxicidad inducida por OTA excepto para grupos de alta exposición alimentaria (Chit-Shing y Hani, 2016). Sin embargo, debido a la limitada información sobre la exposición in útero y a la fetotoxicidad de la OTA, existe aún, un alto grado de incertidumbre sobre el tiempo y el grado de exposición fetal a OTA durante la gestación para que exista la posibilidad de teratogenicidad (Chit-Shing y Hani, 2016; López de Cerain *et al.*, 2000).

De momento el riesgo fetal asociado con la exposición materna sólo se puede estimar, teniendo en cuenta la alta sensibilidad del feto a sustancias tóxicas (Chit-Shing y Hani, 2016). Por ello sería importante, para reducir los riesgos, que en mujeres embarazadas se monitoree la exposición a OTA.

La toxicidad crónica de la OTA, también se ha relacionado con evidencias de cáncer testicular y formación de tumores hepáticos en humanos y en animales (Xiao *et al.*, 2006; Ibrahim *et al.*, 2013; Felizardo y Câmara, 2013).

A la fecha, existe un estudio, que relacionó el Carcinoma Hepatocelular (HCC) con concentraciones elevadas de OTA en suero; habiendo encontrado que en el 95% de las muestras de los pacientes afectados con HCC las concentraciones de OTA eran hasta cinco veces mayores que en las muestras de pacientes sin HCC (Ibrahim *et al.*, 2013). Como conclusión éste estudio reveló una fuerte asociación entre la presencia de OTA en suero y el HCC humano, lo que ofrece una explicación coherente en la descripción de la epidemiología de la enfermedad y los mecanismos de acción de la OTA.

Finalmente, algunos autores apuntan que la OTA tiene un efecto de inmunosupresión, ya que en estudios in vivo con pollos expuestos a OTA por vía oral, hubo una depleción de linfocitos T y B (Biró *et al.*, 2002; Pfohl-Leskowicz y Manderville, 2007). Este efecto tóxico de la OTA es de suma importancia, pues en seres humanos contribuiría a complicaciones de salud, sobre todo en aquellos individuos inmunodeprimidos o en estado de malnutrición (Shephard, 2008; Jayatilake *et al.*, 2013).

2.5.3.- Toxicocinética

La absorción de la OTA se lleva a cabo en el tracto gastrointestinal, mayormente en yeyuno proximal (Fahmy *et al.*, 2014), pasando a la circulación sistémica y detectándose en sangre, músculo, grasa y en los órganos de mayor actividad metabólica como riñón e hígado (Jayatilake *et al.*, 2013). Los mamíferos absorben alrededor del 66% de la cantidad total de OTA ingerida y presentan una biodisponibilidad superior al 50% (excepto rumiantes) (Hagelberg *et al.*, 1989).

Durante su distribución en el organismo, la OTA tiene una alta capacidad de fijación a las proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, y presenta una semivida de eliminación larga; en el hombre de 840 horas (35 días), siendo la fracción libre de toxina < 0,2% (Haighton *et al.*, 2012).

Tanto la OTA como sus metabolitos se excretan por vía renal y hepatobiliar (Stoycho, 2010). En heces y orina y el principal metabolito es la ocratoxina- α (OT α) que resulta de la hidrólisis del enlace amídico, reacción catalizada por carboxipeptidasas y otras enzimas bacterianas (Muñoz, 2017). La presencia de ocratoxina- α en orina se debe a su absorción por las venas mesentéricas y su entrada en la circulación entero-hepática que explica su presencia en orina (Arbillaga *et al.*, 2004, Muñoz, 2017). También se ha reportado que la OTA puede excretarse por los conductos galactóforos de las mujeres en las secreciones lácteas (Dehgham *et al.*, 2014).

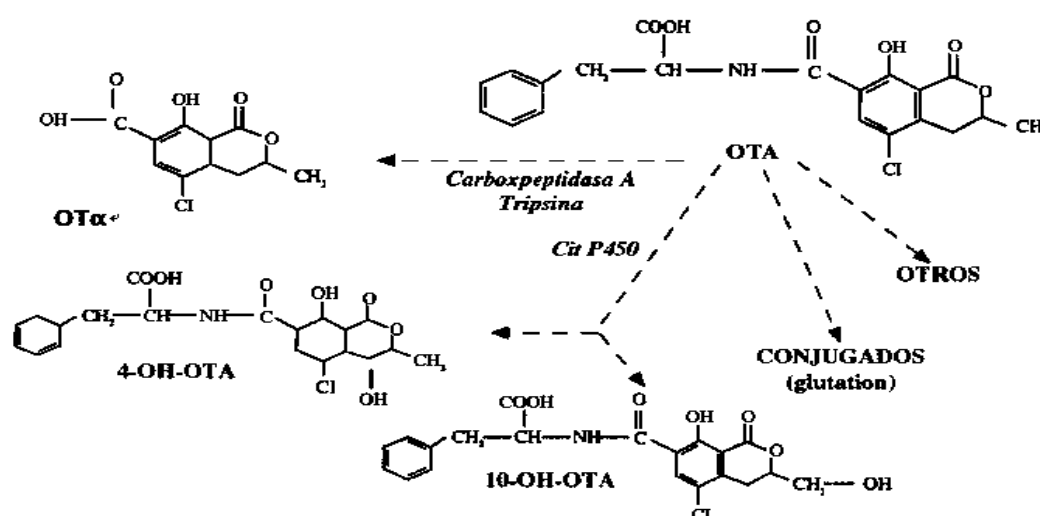


Figura 4. Metabolismo de la ocratoxina A (Ravelo *et al.*, 2011)

2.5.4.- Toxicodinámica

La toxicidad crónica de la OTA se ejerce por los siguientes cuatro mecanismos de acción, principalmente:

1. **Estrés Oxidativo:** La OTA han sido relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno tales como superóxido, Anión (O₂), radical hidroxilo (OH) y peróxido, todas ellas causantes de daño celular oxidativo (Sorreti *et al.*, 2013). El daño oxidativo contribuye a la amplia gama de efectos tóxicos de la OTA pues también altera la respiración celular ya que actúa inhibiendo competitivamente la actividad de la ATPasa, la succinato deshidrogenasa y la citocromo C oxidasa,

obteniendo como productos finales radicales hidroxilados por peroxidación lipídica (Zhu *et al.*, 2016; Kamp *et al.*, 2005).

2. Alteración de la síntesis proteica: la OTA tiene una similitud estructural con la fenilalanina lo que provoca una inhibición competitiva de la Phe-ARNt sintetasa a nivel post- traduccional afectando la síntesis proteica (**Figura 5**) (Ravelo *et al.*, 2011). Estudios *in vitro* con células renales demuestran un efecto inductor de la OTA sobre la caspasa y la protein kinasa que induce a la alteración de la síntesis de ADN con sus consiguientes lesiones (Doi y Uetsuka, 2011).
3. Daño al ADN: En algunos estudios se ha demostrado la OTA promueve la formación de aductos con ADN: Los aductos son lesiones premutagénicas que se producen por la unión covalente entre la OTA y los átomos de N y O de las bases nitrogenadas del ADN. (Kamp *et al.*, 2005; Dorrenhaus *et al.*, 2000; Czakai *et al.*, 2011). También existen datos que apoyan la hipótesis de que el radical fenoxilo de la OTA es el responsable de dar lugar a la formación de aductos. *In vivo* se han obtenido resultados positivos en tejidos de rata y ratón (Li *et al.*, 1997). Sin embargo, actualmente aún no está claro si la OTA reacciona directamente con el ADN o su actividad genotóxica se deriva de un efecto citotóxico que genera especies reactivas capaces de lesionar el ADN (Arbillaga *et al.*, 2004). Algunos estudios, sugieren que la OTA puede promover la inestabilidad genómica y la mutagénesis a través de interferencia en la división celular acelerando la mitosis y dando como resultado una célula hija prematura y con posibles daños en su ADN, especialmente a nivel de las histonas (Czakai *et al.*, 2011). En general, todos los resultados obtenidos en múltiples investigaciones en relación al daño que provoca la OTA al ADN apoyan el efecto de carcinogenicidad de la misma.
4. Secuestro de calcio microsomal: Este mecanismo constituye una reacción temprana y ligada al fenómeno de peroxidación lipídica (Felizardo y Câmara, 2013.). Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* demuestran que la OTA produce una inhibición en el bombeo y captación del calcio a través del retículo endoplásmico del hepatocito. Experimentalmente, se ha demostrado que la tasa de captación de calcio dependiente de ATP se inhibe en un 42 a 45% al tratar ratas con 2.5µg de OTA por kg de peso corporal (Dörrenhaus *et al.*, 1989; Gekle *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que la OTA interrumpe la homeostasis del calcio

microsomal al deteriorar la membrana del retículo endoplasmico por la vía de la peroxidación lipídica lo que conlleva también a la apoptosis celular (Khan *et al.*, 1989).

2.5.5.- Sinergismo y aditividad

El sinergismo entre micotoxinas es definido como el efecto combinado resultante de la acción de dos ó más micotoxinas en los organismos, el cual es superior a la suma del efecto individual de cada micotoxina. (Wyatt, 1991; Jaramillo, 2006) y está relacionado con la acción combinada debido a la exposición humana a múltiples micotoxinas en un mismo alimento y/o en la misma dieta (Gimeno, 2013).

La aditividad entre micotoxinas se define como el efecto combinado resultante de la acción de dos ó más micotoxinas en los organismos el cual es igual a la suma del efecto individual de cada micotoxina (Jaramillo, 2006).

Existen algunos estudios que reportan sinergismo y aditividad entre OTA y otras micotoxinas por ejemplo:

- Combinación de Toxina T-2 + OTA: En pollos expuestos a diferentes dosis por vía oral se observaron los siguientes problemas: se redujo la ganancia de peso y los niveles de proteína, la actividad de la deshidrogenasa láctica en el suero se vio disminuida. La interacción entre estas dos micotoxinas, provocó una elevación en los niveles de triglicéridos en el suero y una disminución de calcio y de la actividad de la gamma glutamil transferasa también en suero (Jaramillo, 2006; Gimeno, 2013).
- Combinación Aflatoxina B1+ OTA : En pollos y cerdos expuestos a distintas dosis por vía oral, se observaron cambios en el tamaño del hígado, bazo y páncreas. Los riñones en ambas especies fueron los más sensibles a la contaminación conjunta y el problema de nefropatía fue el más importante y característico (Gimeno, 2013)
- Combinación Diacetoxiscirpenol (DAS) + OTA: En pollos de engorda se ha observado (a diferentes dosis por vía oral) una disminución del peso vivo a corto plazo y problemas graves de nefropatía (Wyatt, 1991; Gimeno, 2013).

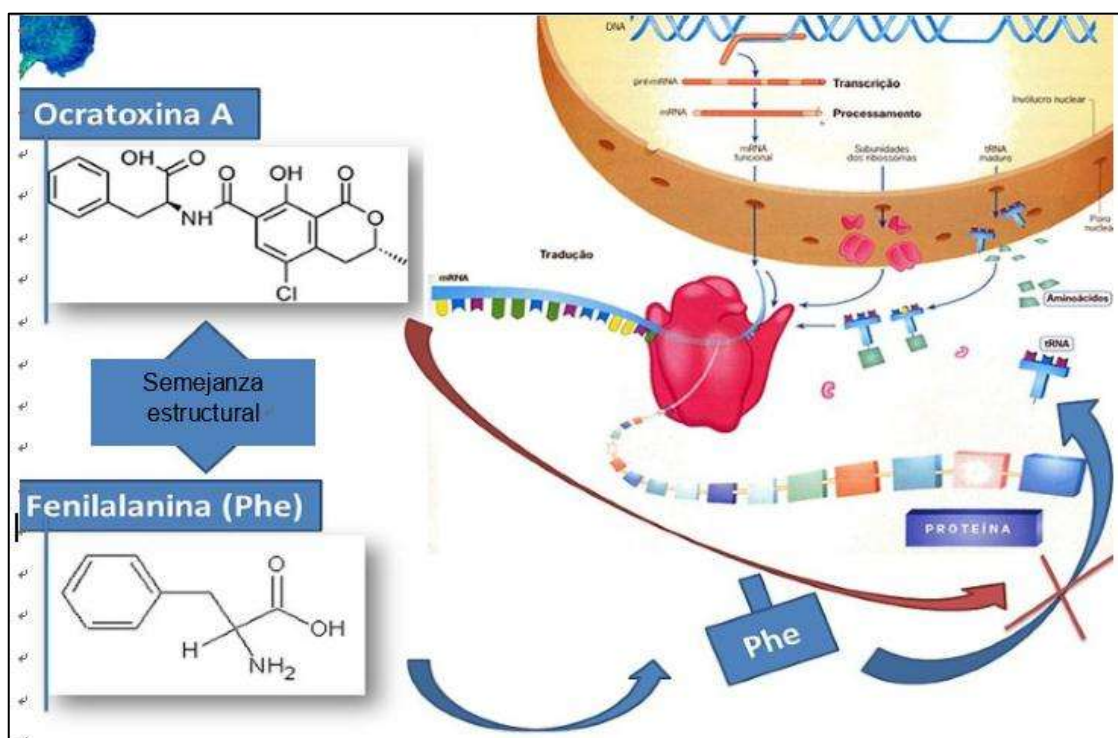


Figura 5. Proceso de inhibición de la síntesis de proteínas por OTA (Ravelo *et al.*, 2011)

2.5.6.- Interacción de OTA con nutrientes

Las interacciones micotoxinas-nutrientes han sido estudiadas por la especial significancia que tienen en tema de nutrición para la salud humana y producción agropecuaria.

Actualmente se cuenta con evidencia de como las micotoxinas interfieren en los procesos de la digestión, metabolismo y transporte de los nutrientes, afectándose la disponibilidad y utilización de los mismos (Jaramillo, 2002).; sin embargo específicamente de OTA, se cuenta con poca información al respecto.

En estudios con aves de engorda expuestas a OTA por vía oral se observó un cuadro de hipocarotenoidemia como evidencia de síndrome de mala absorción y se señaló que la OTA ocasionó el incremento de glucógeno hepático con evidencia de alteración a la gluconeogénesis (Jaramillo, 2002).

2.6.- LEGISLACIÓN DE LA OTA

2.6.1.- Legislación de concentraciones de OTA en productos alimenticios.

Actualmente existen los Reglamento de la Unión Europea (CE) 1831/2003 y 1831/2003 que establece los límites permitidos de OTA en distintos alimentos para alimentación animal (**Tabla 4**) y para el consumo humano (**Tabla 5**) (Moragas, 2007).

Las concentraciones máximas permitidas están bien especificadas, para cereales y sus derivados, uvas de cualquier tipo, vino en general, jugos y néctares, alimentos infantiles, alimentos de uso médico, frutos secos, cacao, productos cárnicos y especias.

En el caso de la cerveza, no existe normativa que regule los niveles de concentración de OTA (Bellver *et al.*, 2014). Por lo general, se detectan pérdidas significativas de OTA en las operaciones de malteado y elaboración del mosto, por ello la mayoría de los países europeos consideran para la cerveza el límite establecido para cereales y derivados reparando en que incluso debería ser menor, puesto que en el proceso de elaboración de la cerveza se incluyen múltiples etapas que reducen la concentración de OTA en el producto final (Prado *et al.*, 2003). Es por ello que países como Alemania y Bélgica determinan como reglamentación para la cerveza el límite de OTA establecido para vinos, que es menor al de cereales y derivados (Gottschalk *et al.*, 2017).

En la reglamentación de la CE la carne y otros tejidos comestibles, se encuentran englobados como productos cárnicos, sin embargo la misma Comisión permite que cada país establezca los límites de OTA que considere prudentes para productos de origen animal específicos, tal es el caso de Italia y Dinamarca que cuentan con reglamentación propia para concentraciones de OTA en carne y órganos de cerdos incluida sangre (Battaccone *et al.*, 2010). Los productos alimenticios para consumo humano realizados a partir de sangre de cerdos o aves pueden suponer un problema de salud ya que la concentración de OTA tiene de a ser alta debido a la unión de la OTA con las proteínas plasmáticas (Hans *et al.*, 2007).

Finalmente, en el caso de los huevos no hay ningún tipo de legislación para residuos de OTA pues la tasa de transferencia es muy baja; así mismo, para leche y derivados lácteos ya que en rumiantes se destruye la mayoría de la OTA antes de ser absorbida, así que el paso a la leche es muy bajo (Hans *et al.*, 2007).

2.6.2.- Legislación en la ingesta humana de OTA

Organismos Internacionales se han encargado de fijar los valores máximos de exposición a OTA en seres humanos con recomendaciones de **Ingesta Diaria Tolerable (IDT)** expresada en nanogramos de OTA por kilogramos de peso de corporal al día (ng/kg p.c./día)

The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food and Additives (JECFA) en 2007 estableció una IDT de 17ng/kg p.c./día (CODEX FAO/OMS 2007).

The European Food Safety Authority (EFSA) en 2006 estableció un IDT de 14 ng/kg p.c./día para población en general, puntualizando que el caso de niños menores de 12 años la IDT no debe ser mayor a: 5 ng/kg p.c./día (Moragas, 2007).

Posteriormente el Scientific Committee for Food de la Unión Europea (SCF, 2007) estableció una IDT de: 5 ng/kg p. c./día.

El Consejo Nórdico de Ministros propuso una Ingesta Provisional Diaria Tolerable (IPDT) de: 5 ng/kg p.c./día, similar a la IPDT establecida en Canadá (1,2 - 5,7 ng/kg p.c./día). También sugirió que en recién nacidos hasta el año de edad, la ingesta diaria semanal sea: máximo de 20ng/ kg p.c. /semana, es decir una IDT de: 2.8ng/kg p.c./día (FAO/OMS 2015). En México, aunque existen normas oficiales que reglamentan aflatoxinas en alimentos (NOM 188-SSA1-2002), no se cuenta con límites máximos permitidos en alimentos ni con valores de IDT a OTA .

Tabla 4. Los límites máximos de contenido de OTA en productos alimenticios para alimentación animal. Reglamento (CE) 576/2006.

PRODUCTO	CONTENIDOS MÁXIMOS ppm (mg/kg)
Materias primas para piensos	
Cereales y productos a base de cereales	0.25
Piensos complementarios y complementos	
- para cerdos	0.05
- para aves de corral	0.10

Tabla 5. Los límites máximos de contenido de OTA en productos alimenticios para consumo humano. Reglamento (CE) 1831/2003 y posteriores modificaciones (105/2010 y 594/2012).

PRODUCTO	CONTENIDOS MÁXIMOS ppb (µg/kg)
Cereales en grano sin transformar (incluidos arroz y alforfón)	5.00
Productos derivados de los cereales (incluidos productos transformados a base de cereales y cereales de grano destinado a consumo humano directo)	3.00
Uvas pasas (corinto, sultanas y otras)	10.0
Café tostado en grano y molido	5.00
Café soluble (instantáneo)	10.0
Vino (tinto, blanco, rosado, espumoso) y otras bebidas a base de vino y cocteles aromatizados de productos vinícolas.	2.00
Jugo de uva y otras bebidas incluidas néctar y jugo reconstituido.	2.00
Mosto de uva (incluido mosto reconstituido para consumo humano directo)	2.00
Alimentos a base de cereales y alimentos infantiles	0.50
Alimentos dietéticos destinados a uso médico y alimentos para lactantes	0.50
Café verde, frutos secos (excepto uvas pasas), cacao, productos cárnicos y especias (incluidas especias desecadas)	15.0
Regaliz (ingrediente para infusiones)	20.0
Extracto de regaliz para uso en bebidas y confitería	80.0
Gluten de trigo no destinado a la venta directa al consumidor	8.00

2.7.- DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OTA

En la actualidad las técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de OTA en diferentes matrices buscan: facilitar la preparación de la muestra, automatizar los procedimientos y alcanzar una alta sensibilidad al analito (Huybrechts y Tangni, 2010). Es por ello que han surgido técnicas novedosas como: la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a la espectrometría de masas (MS), la HPLC acoplada a un detector de fluorescencia, la técnica cualitativa y cuantitativa del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayos sobre *Artemia salina* (Dohnal *et al.*, 2013).

La HPLC es el único método certificado por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) para determinación y cuantificación de micotoxinas (Dohnal *et al.*, 2013), pero tiene la desventaja de que sus equipos y solventes son muy costosos además de requerir personal altamente capacitado (Chung-Hsuan, 2008). Este hecho ha potenciado el desarrollo y comercialización de otros métodos de análisis más económicos, como ELISA, que permiten su uso para fines de control y en aquellas situaciones en las se requiere tomar decisiones rápidas (Pineda *et al.*, 2012; Huybrechts y Tangni, 2010).

Por tanto, a la hora de seleccionar el método para el análisis de OTA, es necesario considerar el propósito del estudio, la matriz que se va analizar, el límite de detección requerido, la experiencia, la infraestructura y el personal disponible (Shephard, 2008).

2.7.1.- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Ésta es un de las técnicas más ampliamente utilizadas en el análisis de OTA. Entre las ventajas más importantes que presenta se encuentra la posibilidad de separar sustancias termolábiles, no volátiles, polares y apolares con alta resolución entre sustancias químicamente similares de manera rápida y reproducible (Abián *et al.*, 2008).

Se distinguen dos tipos de HPLC: de fase normal y de fase reversa, en ambas la fase estacionaria se soporta sobre partículas de sílice o aluminio de 3,5 o 10 µm. En fase normal, la fase estacionaria es polar (grupos ciano, amino y diol) y la fase móvil no polar (hexano o iso-propileter). En la fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil polar (agua, metanol, o acetonitrilo). En fase normal, el componente menos polar es el que eluye primero y en fase inversa el componente más polar es el primero en eluir (Serrano, 2012).

Los detectores del equipo de HPLC utilizados comúnmente para OTA son: UV, fluorescencia, arreglo de diodos y Tiempo de vuelo (Serrano, 2012; Pineda *et al.*, 2012).

2.7.2.- Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, con mayor frecuencia positivamente, separados por su relación masa/carga (m/z) y posteriormente detectados y registrados (Solfrizzo *et al.*, 2011).

La importancia y proyección de la MS es debido a su potencial analítico. Las ventajas de esta técnica se pueden resumir en los siguientes aspectos: proporciona una insuperable especificidad en la determinación del peso molecular debido a la posibilidad de medir exactamente su masa molecular así como obtener información a partir de los fragmentos iónicos de un analito (Abián *et al.*, 2008; Serrano, 2012).

Su sensibilidad es muy elevada y en teoría, la MS permite detectar una única molécula. Se ha demostrado la detección de moléculas en cantidades de moles y femtomoles (Solfrizzo *et al.*, 2011). Es muy versátil, ya que permite determinar la estructura de compuestos muy diversos. Es aplicable a los elementos y a todo tipo de muestras, volátiles, no volátiles, polares y apolares, sólidos, líquidos y gases (Hauschild *et al.*, 2007). En combinación con otras técnicas de última generación (Cuadrapolos, Trampa Iónica, en Tándem etc.) es la más calificada para analizar muestras complejas reales (Abián *et al.*, 2008; Solfrizzo *et al.*, 2011) por ello es el método oficial de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists). El análisis por espectrometría de masas se realiza en cuatro etapas básicas:

1. Introducción de muestras: pueden ser introducidas directamente a la fuente de iones del espectrómetro en una sonda, o en el caso de mezclas, por un sistema intermediario (Cromatógrafo de Gases, Cromatógrafo de Líquidos, Electroforesis capilar, etc.).
2. Ionización de la muestra, en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones.
3. Separación y análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación masa/carga (m/z).

4. Finalmente, se obtiene el espectro de masas, en el que se presenta la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación m/z . (Serrano, 2012; Valcárcel y Gómez-Hens, 2003).

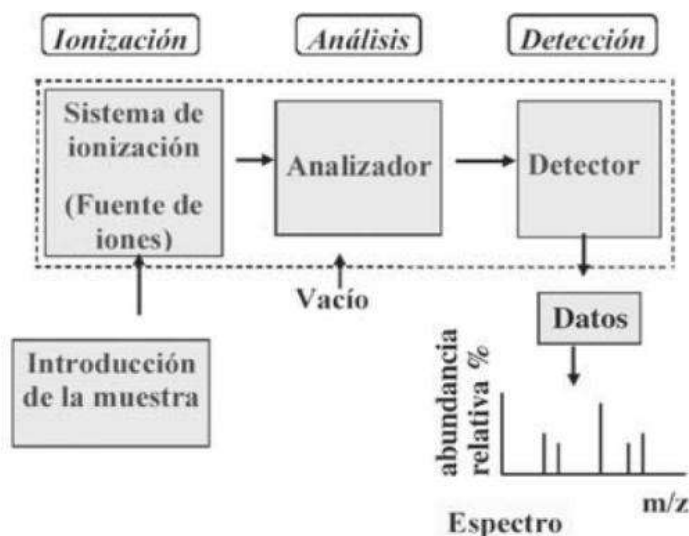


Figura 6. Esquema de un espectrómetro de masas (Serrano 2012)

2.7.3.- Inmunoensayos ELISA

La técnica ELISA se utiliza comúnmente en el análisis de micotoxinas y se basa en la reacción antígeno-anticuerpo; puede ser competitiva directa o indirecta (Shephard, 2008). Ambas presentan sus ventajas e inconvenientes, pero la indirecta es más económica y generalmente más es sensible (Carreño *et al.*, 2009).

Actualmente en el mercado existen kits de ELISA cuyas principales ventajas son los bajos requerimientos de volumen de muestra, la rapidez, simplicidad, especificidad, sensibilidad y portabilidad, permitiendo su uso en el campo para la detección de micotoxinas en alimentos y piensos (Frank y Hargreaves, 2003).

Uno de los inconvenientes de ELISA, es el efecto matriz: compuestos similares pueden interactuar con los anticuerpos, lo que provoca subestimaciones y sobreestimaciones de las micotoxinas (Zhang *et al.*, 2011).

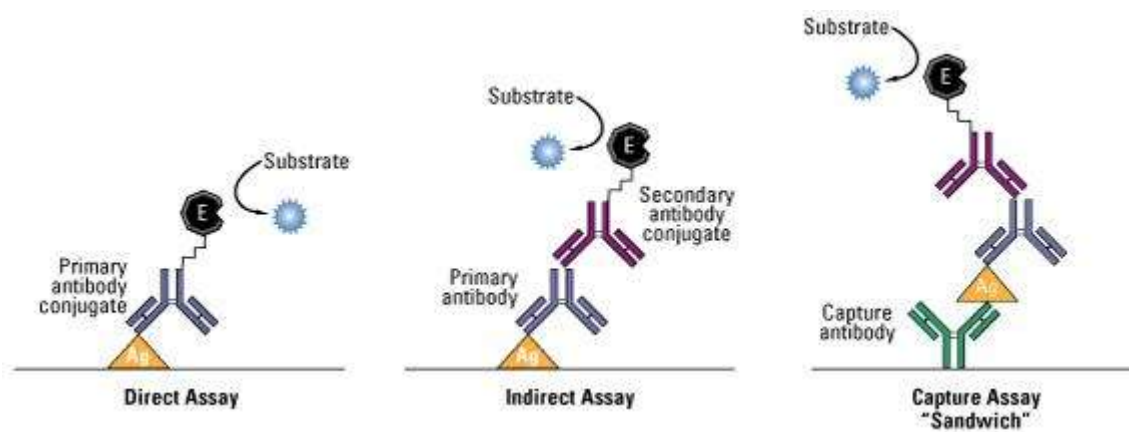


Figura 7: Tipos de ELISA (Protein Biology Resource Library)

2.8.- EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN HUMANA A OTA

Para conocer y evaluar la exposición a la OTA existen los métodos convencionales, que combinan datos de contaminación en alimentos con datos de ingesta poblacionales; pero además, se han propuesto otros métodos basados en matrices biológicas para determinar OTA en sangre y en orina cuyos resultados pueden relacionarse con los obtenidos por los métodos comunes (Frank y Hargreaves, 2003; Scott, 2005).

Estos últimos tienen la ventaja de no verse afectados por el efecto de las diferentes matrices alimentarias y de reducir la variabilidad entre individuos asociada a la absorción intestinal (Scott, 2005). Actualmente existe una controversia de qué matriz ofrece los mejores resultados de exposición humana a OTA, si los urinarios o las concentraciones detectadas en sangre (Scott, 2005; Xiang *et al.*, 2009; Huybrechts y Tangni, 2010).

Sin embargo cabe destacar que correlacionar el consumo de un sólo alimento con concentraciones de OTA ya sea en sangre u orina es complejo debido a múltiples factores que intervienen como la variedad de platillos que se consumen regularmente en la dieta y la gran cantidad de alimentos susceptibles a contaminación por OTA (Cramer *et al.*, 2015; Quintana *et al.*, 2007; Dohnal *et al.*, 2013).

Por lo anterior, sólo es posible hacer una estimación de la exposición a OTA y compararla con la legislación existente.

Para realizar una estimación de exposición a OTA y poder compararla con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) se debe calcular la Ingesta Diaria Continua (IDC) y expresarla en nanogramos por kilogramo de peso corporal al día (ng/kg p.c./día) (Scott, 2005).

2.8.1.- Estimación de Ingesta de OTA a partir de concentraciones conocidas en alimentos.

Para estimar la exposición a OTA a partir de la ingesta es necesario contar con determinación de OTA en alimentos, de preferencia propios de la población en estudio. En caso de no disponer con datos de alimentos locales pueden usarse como referencia las concentraciones determinadas en alimentos similares reportados en la bibliografía (Scott, 2005; Xiang *et al.*, 2009; Huybrechts y Tangni, 2010). También se requiere de herramientas dietéticas para conocer los patrones de consumo de la población.

2.8.2.- Estimación de Ingesta de OTA a partir de Matrices Biológicas.

En el caso de la OTA, debido a su toxicodinamia las matrices biológicas utilizadas para su detección son: sangre (suero o plasma) y orina. Estas matrices funcionan como posibles indicadores de riesgo o de enfermedad presente (Hodgson *et al.*, 2009; Halbin *et al.*, 2014). En el caso de la OTA en sangre, se han reportado concentraciones desde no detectables hasta excepcionalmente altas, como las encontradas en pacientes con BEN de hasta 1800ng/mL (Scott, 2005), igualmente en orina hay reportes de concentraciones de OTα desde no detectables hasta mayores 300ng/mL. (Fazekas *et al.*, 2005).

Sin embargo debido a los rangos tan amplios de concentraciones de OTA encontrados en estudios con diversas poblaciones de distintos países y con características tan particulares como edad, género, antecedentes patológicos personales e incluso realizados en diferentes estaciones del año; que no se ha podido establecer concentraciones normales de OTA en sangre ni en orina (Aslam *et al.*, 2005; Assaf *et al.*, 2004; Scott 2005; Fazekas *et al.*, 2005).

Por lo mismo, sólo se puede estimar la exposición en función de las matrices, y para ello la mayoría de los estudios utilizan la ecuación de Klassen (Scott, 2005; Motta, 2009; Pérez de Obanos *et al.*, 2001; Gilbert, 2001) que calcula IDC, utilizando en su fórmula, la concentración plasmática o en suero de OTA, la depuración plasmática o filtración renal y la biodisponibilidad (Assaf *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2001; Fazekas *et al.*, 2005; Aslam *et al.*, 2005; Hassen *et al.*, 2004) como se muestra a continuación:

$$K_0 = \frac{CLP(C_s)}{A}$$

$$K_0 = \frac{0.99(C_s)}{0.5}$$

Dónde:

- K₀ : IDC de OTA (ng/kg p.c./día).
- CLP: aclaramiento renal (ml/kgpc./día) = 0.99 (constante para personas sanas con peso promedio de 70kg)
- C_s: concentración en suero de la OTA (ng/ml).
- A: biodisponibilidad de la OTA= 0,5 (constante de biodisponibilidad considerada al 50%)
- PC: peso corporal (kg)

3.- JUSTIFICACIÓN

La Ocratoxina A (**OTA**) es una micotoxina que puede estar presente en una gran variedad de alimentos principalmente: cereales y derivados; mismos que tienen un alto impacto nutricional y económico a nivel mundial (Shephard, 2008); por ello conocer el grado de contaminación de estos productos, es primordial para poder asegurar su inocuidad.

Los efectos nocivos de la OTA, tanto a corto como a largo plazo, están ampliamente descritos en la literatura; y sí bien, son inusuales las intoxicaciones agudas por OTA en humanos, la toxicidad crónica representa el verdadero peligro, debido a que se almacena en los tejidos ocasionando lesiones paulatinas a las células promoviendo procesos mutagénicos y carcinogénicos; así como daños irreversibles a los órganos (riñones, hígado) y al sistema inmune (López de Cerain *et al.*, 2000; Mantle *et al.*, 2015; Ravelo *et al.*, 2011). Por lo anterior, la ingesta prolongada de OTA, aunque sea en pequeñas cantidades, representa una amenaza para la salud. Todos los resultados encontrados sobre los efectos tóxicos de la OTA ponen de manifiesto la necesidad de evaluar la exposición humana a dicha micotoxina.

En países en vías de desarrollo donde el estado nutricional de su población puede estar comprometido, el consumo de alimentos vegetales o productos animales contaminados con OTA fomenta el círculo pobreza-malnutrición-inmunosupresión-enfermedad, y sí bien muchas patologías son multifactoriales, la OTA puede ser un elemento determinante en el desarrollo de alguna(s) de ellas. En nuestro país, a pesar de que se cuenta con estudios que confirman la presencia de OTA en algunos productos alimenticios (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; Robledo *et al.*, 2001; Sierra, 2004; Espinosa *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2013; Castillo y Robinson, 2016), la legislación no fija límites de concentración en alimentos ni valores de ingesta diaria tolerable para OTA. Tampoco existen estudios de exposición humana a OTA, de manera que se desconoce el impacto de la misma en la salud de la población. Sin embargo se puede inferir que debido a que la dieta mexicana se conforma, aproximadamente, por un 64% de cereales (ENSANUT 2012) y como se sabe, es un grupo de alimentos susceptible a contaminación por OTA, es muy probable que efectivamente estemos expuestos a ella.

La finalidad de este estudio es estimar la exposición a OTA a través de indicadores dietéticos y concentraciones en suero sanguíneo, como un primer diagnóstico poblacional en México.

4.- HIPOTESIS:

Al menos el 60% de las pacientes ambulatorias del Hospital de la Mujer de Michoacán, presentan concentraciones detectables de OTA en suero y la Ingesta Diaria Continua de la población rebasa el límite establecido de Ingesta Diaria Tolerable.

5.- OBJETIVOS:

5.1.- OBJETIVO GENERAL

Estimar la exposición a Ocratoxina A en una población de pacientes ambulatorios del Hospital de la Mujer de Michoacán, mediante el análisis de indicadores dietéticos y de concentraciones de OTA en suero sanguíneo.

5.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de OTA en suero mediante técnicas de detección y cuantificación de la toxina.
2. Analizar mediante indicadores dietéticos, la posible ingesta de OTA por medio del análisis de los patrones de consumo alimentario de la población.
3. Estimar la Ingesta Diaria Continua (IDC) de OTA en la población de pacientes ambulatorias del Hospital de la Mujer y compararla con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) que establecen los Organismos Internacionales (EFSA, FAO/OMS y SCF).

6.- MATERIAL Y MÉTODOS:

6.1.- DISEÑO DE ESTUDIO

Estudio observacional, descriptivo y transversal.

6.2.- POBLACIÓN EN ESTUDIO

Pacientes ambulatorios del Hospital de la Mujer de Michoacán.

6.3.- CRITERIOS DE SELECCIÓN

6.3.1.- Inclusión

- Mujeres mayores de edad entre 18 y 60 años de edad que acudían al laboratorio para toma de muestra sanguínea y que desearon participar:
- Contestando un Cuestionario de Antecedentes Médicos.
- Contestando un Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos.
- Permitiendo que se les tomaran medidas antropométricas: peso y talla.
- Permitiendo que se les extrajeran 5ml extras de muestra sanguínea.

6.3.2.- Exclusión

- Mujeres embarazadas, mujeres que fueran a ser ingresadas a hospitalización.
- Pacientes ambulatorias que no contaran con orden de laboratorio para toma de muestra sanguínea.

6.3.3.- Eliminación

- Mujeres que no contestaron correctamente el Cuestionario de Antecedentes Médicos y/o el Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos
- Pacientes que posterior al análisis de la primera toma de muestra sanguínea resultaron con diagnóstico de embarazo.

6.4.- CÁLCULO DE MUESTRA

Debido a que en el estado de Michoacán no existen datos sobre la incidencia ni prevalencia de exposición humana a OTA; el tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a las estadísticas reportadas en la literatura internacional en relación a la exposición

humana a OTA, considerando para el cálculo de la muestra la prevalencia más baja encontrada.

Los datos encontrados en la literatura de la prevalencia más alta y la más baja fueron los siguientes:

Tabla 6. Estudios con mayor y menor prevalencia de OTA en sangre.

Estudio	Prevalencia (%)	Referencia
Determinación de OTA en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA	95	Quintana <i>et al.</i> 2007.
Biomarkers of human exposure to ochratoxin A	60	Scott, 2005.

Se utilizó la fórmula para población finita:

$$n = \frac{Nz^2pq}{d^2(N-1) + z^2pq}$$

Dónde:

- n= Tamaño de muestra
- p= Prevalencia más baja de OTA en plasma encontrada en la literatura. p=60
- q= 1- p
- z= Valor crítico de la distribución normal estandarizada. Se utilizará un nivel de confianza del 95%. z=1.96
- d= Precisión o error máximo permisible. Error tipo 1. d= 0.05.
- N: Población de mujeres que sean pacientes ambulatorias que acuden a toma de muestra sanguínea de primera vez al Laboratorio del Hospital de la Mujer al mes.

Al sustituir dichos valores en la fórmula anterior, se obtiene lo siguiente:

$$n = \frac{(N)(1.96)^2((60)(1-60))}{0.05^2(N-1) + ((1.96)^2(60)(1-60))}$$

$$n = 129.9$$

Para evitar pérdida de muestras por criterios de eliminación se aumentó un 10%, resultando una $n=$ de 143 que se redondeo a $n= 150$.

6.5.- TIPO DE MUESTREO

Se realizó un tipo de muestreo no probabilístico, de conveniencia. Se seleccionaron directa e intencionalmente a las mujeres (que cumplieran con los criterios de selección) a las que se tuvo fácil acceso y que contaban con disponibilidad de tiempo. Esto debido a que se desconocía el número de mujeres que llegarían a su cita en el laboratorio.

El muestreo se llevó a cabo por personal capacitado previamente. Fueron dos pasantes de la Licenciatura en Nutrición de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, quienes apoyaron en la selección de las participantes y en la aplicación de los instrumentos de medición. Se elaboró un manual de procedimientos para la estandarización de procesos.

La toma de muestra sanguínea la realizaron los Químicos-farmacobiólogos del turno matutino del Laboratorio.

6.6.- CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio se definió de mínimo riesgo, ya que no se puso en peligro la integridad de las personas que participaron en él.

Se apegó a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios de para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos y en “Los principios éticos para la investigación médica en seres humanos” de la Declaración de Helsinki.

El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética del Hospital de la Mujer de Michoacán (**ANEXO 1**), y se cuenta con una Carta Consentimiento Informado (**ANEXO 2**) firmada por todas las participantes previo a la toma de muestra sanguínea y a la aplicación de los instrumentos de medición.

6.7.- VARIABLES

Tabla 7. Descripción de las variables de estudio.

Variables	Operacionalización de variables	Tipo de variable	Escala de medición
<u>Variables bioquímicas</u> 1. Concentración de OTA en plasma sanguíneo	Concentración total OTA determinada por método de ELISA	Dependiente	Cuantitativa (ng/L)
<u>Variables dietéticas</u> 2. Ingesta de alimentos	Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos (CFCA) del Instituto Nacional de Salud Pública	Independiente	Cuantitativa (% , gr) Cualitativa (adecuada, equilibrada, variada, completa)
<u>Variables antropométricas</u> 3. Peso	Manual de procedimiento para proyectos de nutrición del Instituto Nacional de Salud Pública	Independiente	Cuantitativa (kg)
4. Talla	Manual de procedimiento para proyectos de nutrición del Instituto Nacional de Salud Pública	Independiente	Cuantitativa (m)
5. Índice de masa corporal (IMC)	Clasificación de la Organización Mundial de la salud para IMC	Independiente	Cuantitativa (kg/m ²)

6.8.- INSTRUMENTOS DE MEDICION

6.8.1.- Cuestionario de Antecedentes Médicos

Para conocer datos demográficos e información sobre su estado general de salud, se utilizó el Cuestionario de Antecedentes Médicos, (basado en el Cuestionario de Antecedentes Médicos del Hospital General de México con modificaciones de acuerdo al interés del presente estudio) (**ANEXO 3**), en el que se recabó: 1) información general: nombre, edad, lugar de origen, domicilio y número telefónico móvil o fijo, 2) número de registro, 3) peso y talla, así como el IMC, 4) Antecedentes Patológicos Personales, 5) Antecedentes Heredo-familiares.

6.8.2.- Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos (CFCA)

Para conocer los patrones de consumo de alimentos y estimar la ingesta diaria continua de OTA, se utilizó el Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos (CFCA) del Instituto Nacional de Salud Pública y el software SNUT versión 3.0 (Sistema de Evaluación de Hábitos Nutricionales y Consumo de Nutrientes), creados y utilizados en mujeres mexicanas (**ANEXO 4**). Dichas herramientas evalúan la cantidad y calidad de la dieta.

El cuestionario consta de 12 secciones, en donde se interroga la frecuencia de consumo de alimentos durante el último año, de un total de 104 alimentos. Dichas secciones son las siguientes: 1) Productos lácteos, 2) Frutas, 3) Huevo, carnes y embutidos, 4) Verduras, 5) Leguminosas, 6) Cereales, 7) Golosinas, 8) Bebidas, 9) Aceites, 10) Antojitos, 11) Otros alimentos, 12) Azúcares, sal y suplementos nutricionales.

6.8.3.- Antropometría:

Se tomaron las medidas antropométricas de peso corporal y talla según las técnicas descritas en el Manual de procedimientos para proyectos de nutrición del Instituto Nacional de Salud Pública (Villalpando y Rivera, 2007). Las técnicas se citan a continuación.

Condiciones necesarias para la toma de medidas antropométricas:

- La exploración se realizará en una estancia suficientemente amplia y a una temperatura confortable.
- El material deberá ser el mismo cada vez y deberá encontrarse calibrado y comprobada su exactitud antes de iniciar la toma de las medidas.

- La exploración se iniciará marcando los puntos anatómicos y las referencias antropométricas necesarias para el estudio.
- Las medidas se tomarán siguiendo un orden práctico y cómodo para el estudiado.
- Las mediciones deberán llevarse a cabo por el mismo evaluador previamente estandarizado.

1) Peso corporal:

- Definición: En sentido estricto, debería usarse el término de masa corporal en lugar de peso corporal. La masa corporal es un concepto que se emplea para designar la cantidad de materia presente en un cuerpo humano.
- Instrumental: Báscula o balanza para pesar personas. La medida del peso corporal se expresa en kilogramos (kg.), con una precisión de 0. 1 kg.
- Técnica: El sujeto se sitúa de pie en el centro de la plataforma de la báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas, sin que el cuerpo este en contacto con nada que haya alrededor y con los brazos colgando libremente a ambos lados del cuerpo. La medida se realiza sin zapatos ni adornos personales y por duplicado.

2) Estatura:

- Definición: La estatura se define como la distancia que existe entre el vértex y el plano de sustentación. También se le denomina como talla en bipedestación o talla de pie, o simplemente como talla.
- Instrumental: Estadímetro. La medida de la estatura se expresa en centímetros (cm), con una precisión de 1 mm.
- Técnica: El sujeto se coloca de pie, completamente estirado, con los talones juntos y apoyados en el tope posterior y de forma que el borde interno de los pies formen un ángulo de aproximadamente 60 grados. Las nalgas y la parte alta de la espalda contactan con la tabla vertical del estadiómetro. El antropometrista coloca la cabeza del estudiado en el plano de Frankfort y realiza una tracción de la cabeza a nivel de los procesos mastoides, para facilitar la extensión completa de la columna vertebral. Se indica al sujeto que realice una inspiración profunda sin levantar la planta de los pies y manteniendo la posición de la cabeza. Se desciende lentamente la plataforma horizontal del estadiómetro hasta contactar con la cabeza

del estudiado, ejerciendo una suave presión para minimizar el efecto del pelo. En esta medida el sujeto deberá estar descalzo. Se realizará por duplicado.

3) IMC (índice de masa corporal):

- Definición: es una medida de asociación entre la masa y la talla de un individuo ideada por el estadístico belga Adolphe Quetelet, por lo que también se conoce como índice de Quetelet.
- Se calcula según la expresión matemática:

$$IMC = \frac{\text{Peso kg}}{\text{Talla m}^2}$$

- En el caso de los adultos se ha utilizado como un recurso para evaluar su estado nutricional, de acuerdo con los valores propuestos por la Organización Mundial de la Salud (OMS 1997).

Tabla 8. Clasificación de IMC acuerdo a la OMS (1997).

IMC kg/m ²	Clasificación
<18.5	Desnutrición
18.5-24.9	Normal
25.0-29.9	Sobrepeso
30.0-34.9	obesidad I
35.0-39.9	obesidad II
>39.9	obesidad III

6.9.- PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

6.9.1.- Etapa de muestreo

Esta etapa abarcó un total de 3 meses de mayo a julio de 2016. Se invitó a las mujeres, pacientes ambulatorias del Hospital de la Mujer que acudían a su cita de laboratorio para toma de muestra sanguínea y que no estaban embarazadas. Si accedían a participar debían firmar la Carta de Consentimiento Informado. En la **Figura 8.** se muestra un diagrama de flujo de esta etapa.

- Una vez que firmaron la Carta de Consentimiento informado, se procedió a la aplicación de las herramientas de medición:
 - 1) Cuestionario de Antecedentes Médicos: 3 minutos aproximadamente
 - 2) CFCA: 20 minutos aproximadamente
- Cuando llegó el turno de la participante de ingresar al cubículo donde se toma la muestra sanguínea se solicitó al químicofarmacobiólogo que le extrajera 2.5 ml de sangre venosa con material nuevo estéril descartable y se reservó la muestra en tubos BD Vacutainer® para separar suero.
- Los tubos con la muestra sanguínea se almacenaron en una hielera con Gel Packs® (bolsas plásticas llenas de gel refrigerante) para mantenerlas a una temperatura fresca sin llegar a congelación y posteriormente fueron transportadas al Laboratorio de Desarrollo Analítico de la Facultad de Medicina de la UMSNH en un plazo no mayor a 4 horas.
- Una vez que se tomó la muestra sanguínea a la participante se le solicitó pasar a un espacio acondicionado con una báscula mecánica con estadímetro marca Nuevo León® con capacidad de 160 kg y longitud de 2 m. con precisión de 100g y cinco mm. respectivamente, para la toma de medidas antropométricas con las técnicas anteriormente descritas:
 - 1) Peso: 30 segundos aproximadamente.
 - 2) Talla: 30 segundos aproximadamente.
- Por último se le entregó un tríptico diseñado de manera práctica y de fácil entendimiento, con la información del proyecto resumida y con los datos del contacto para que la participante solicitara mayor información, si así lo deseaba.

6.9.2.- Tratamiento de la muestra sanguínea

- Esta etapa se realizó en el laboratorio de Desarrollo Analítico de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, donde se separó el suero de las muestras por medio de centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.
- De cada muestra sanguínea se obtuvieron alrededor de 1mL de suero; el cual se separaron dos alícuotas de 500µl y se colocaron en tubos Eppendorf® etiquetados con fecha y número de registro de cada paciente para llevarse a almacenar en un ultracongelador a -25°C donde permanecieron hasta su análisis.

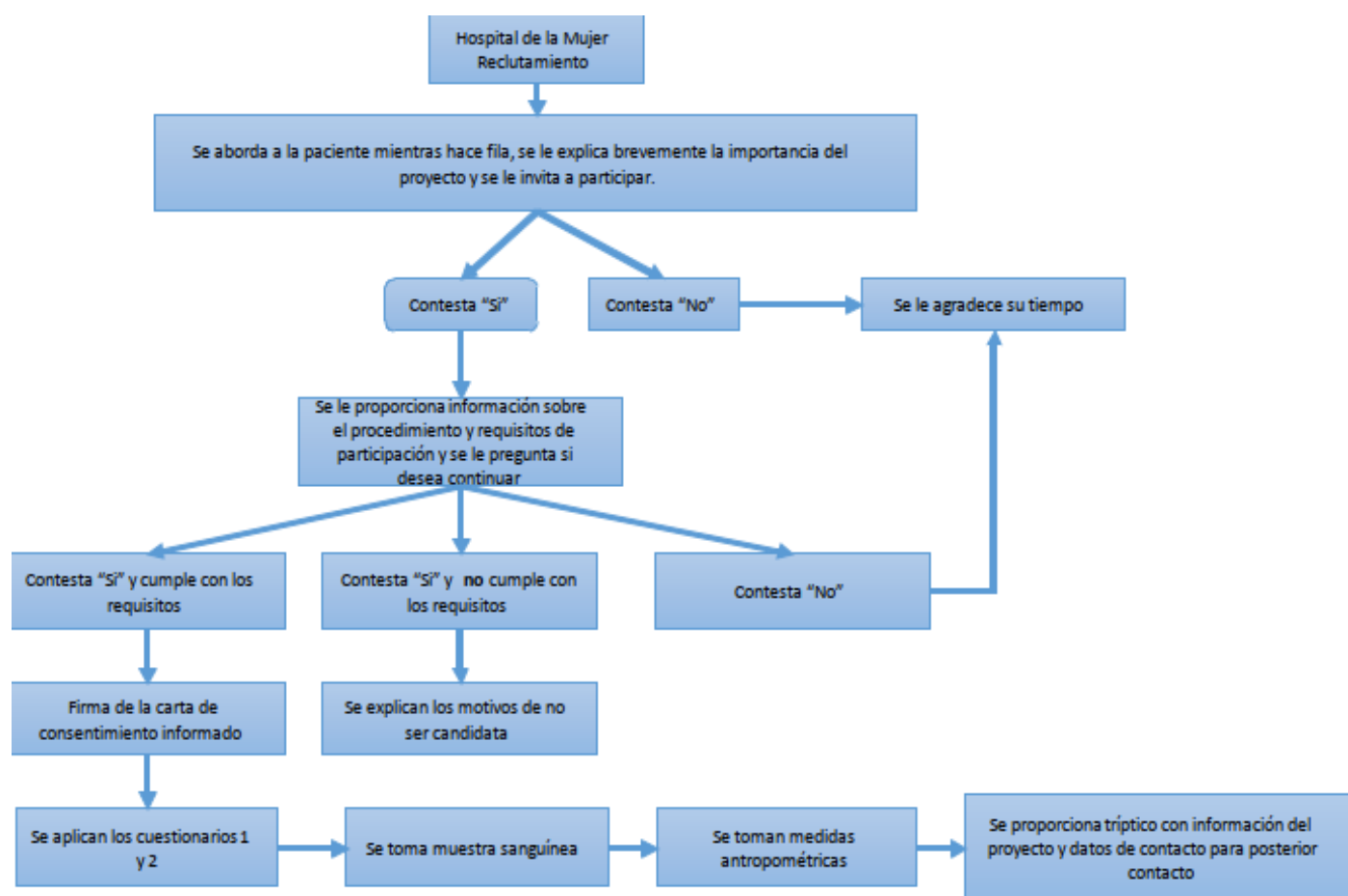


Figura 8. Diagrama de flujo para el muestreo de las mujeres.

6.9.3.- Análisis de las muestras

1) Determinación de OTA por método de ELISA: se utilizó el Kit comercial: Quantitative Assay for OTA in Human and Animal Serum and Milk Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 96-wellkit (Helica Biosystems, Inc., Santa Ana, CA) conservado a temperatura de refrigeración (2- 4°C) hasta su uso.

Los procedimientos se llevaron a cabo para cada muestra siguiendo las instrucciones del fabricante descritas a continuación:

- Preparación de la muestra: de una alícuota de 500µl de suero se separaron 250µl y se adicionaron 750µl de metanol, se mezcló vigorosamente y se dejó reposar por 5min. a temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante para su análisis.

- Método de ELISA: los viales cuentan con diluciones en serie conocidas de OTA en 70% de metanol que sirve como estándares de calibración (**Tabla 9**).
- Todos los reactivos se llevaron a temperatura ambiente 30min antes de usarse.
- Se reconstituyó el paquete PBS-Tween agregando el contenido en polvo a un litro de agua destilada.
- Se colocaron en cada pocillo de mezclado 200µl de diluyente. Se adicionó 100µl de cada estándar y muestra preparada. Mezclar pipeteando al menos 3 veces.
- Se transfirieron 100µl de cada pocillo de mezclado a su correspondiente pocillo de la placa sensibilizada con anticuerpos para OTA y se dejó incubar por 30min a temperatura ambiente.
- Se removió el líquido de los pocillos y se lavó 3 veces con 200µl de solución de lavado PBS-Tween.
- Se agregaron 100 µl de conjugado enzimático a cada pocillo. Se mezcló e incubó por 30min. a temperatura ambiente.
- Se removió el líquido de los pocillos y se lavó 3 veces con 200µl de solución de lavado PBS-Tween.
- Se agregaron 100 µl de cromógeno a cada pocillo, se mezcló e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Se agregaron 100 µl de solución de paro, en la misma secuencia que se siguió con el reactivo anterior.
- Se midió la densidad óptica (DO) en unidades de absorbancia de cada pocillo utilizando un espectrofotómetro UV/Vis & Vis instrumentation Thermo Fisher Scientific® con un filtro de 450 nm.
- Se construyó una curva dosis-respuesta de las DO contra la concentración de OTA conocida a partir de los estándares.
- Se calcularon las concentraciones en suero (ng / mL) por interpolación de la ecuación de la recta.
- El ensayo se realizó por duplicado.

Tabla 9. Valores de OTA en estándares y en suero* (Helica: Quantitative Assay for OTA in Human and Animal Serum and Milk Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Estándar (viales) ng/mL	Muestra (suero) ng/mL
0.0	0.0
0.02	0.08
0.05	0.20
0.10	0.40
0.20	0.80
0.40	1.60

*La muestra se diluye 1:4 con los solventes de extracción de OTA, por lo que las concentraciones en las muestras serán 4 veces mayores.

2) Determinación de OTA por método de HPLC MS: estos procedimientos, exceptuando la extracción de OTA, se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cromatografía y Espectrofotometría de masas (CROM-MASS) de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Por disposición de la institución no fue posible realizar el análisis del total de las muestras por lo que hubo que seleccionar aleatoriamente 50 muestras previamente analizadas por método de ELISA.

- Extracción de OTA: se siguió el método descrito por (Bauer y Gareis, 1987) para cada muestra.
- A una alícuota de 500µl de suero se le agregaron 2.5 mL de HCl a 1N y 4 mL de diclorometano.
- Se agitó por 5 minutos y luego se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos.
- Se eliminó la capa superior y se filtró; se tomaron 3.0 mL y se les agregó 3.0 ml de NaHCO₃ a 0.13 M a pH 8.1. Se agitó por 5 minutos.
- Se centrifugó 5 minutos a 3500 rpm y se descartó la parte superior del sobrenadante.
- Se repitió el último paso y se agregó 1.0 ml de HCl a 1N y 3.0 ml de diclorometano. Se agitó por 10 minutos.
- Se centrifugó 5 min. a 3500 rpm y se retiró el sobrenadante.

- Método HPLC MS: para las determinaciones por este método, se utilizó un patrón de OTA con las siguientes características: (**Tabla 10**)

Tabla 10. Características del Patrón de OTA

Se preparó una solución madre bajo las siguientes condiciones:

Volumen preparado (mL)	2,0			
Solvente	MeOH			
Metabolito	Marca	Peso, mg	Pureza	Concentración $\mu\text{g/mL}$
Ocratoxina A	Sigma-Aldrich	0,482	98%	236

- Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de líquido de alta eficiencia, HPLC 1200 Series® (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una unidad de desgasificación de disolvente al vacío (G1379B), una bomba binaria de gradiente (G1312A), un inyector automático de muestras (G1367B) y una unidad termostada para la columna (G1316A).
- La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna C18 Kinetex® (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.; 100 × 4,6 mm d.i., 2.6 μm de tamaño de partícula) a 40 °C.
- La fase móvil fue una solución acuosa al 0.2% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo y ácido fórmico al 0.2% (B). La condición inicial de gradiente fue de 95% de A y 5% de B cambiando linealmente hasta 10% de B en 3 min, luego 20% de B en 5 min. y 80% de B en 10 min. se mantuvo durante 5 min, cambió a 100% de B en 5 min. y se mantuvo durante 5 min. el retorno a las condiciones iniciales se hizo en 15 min.; el tiempo total de la corrida fue de 40 min.
- El flujo fue de 0.2 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 μL . El cromatógrafo líquido se conectó a un espectrómetro de masas de trampa de iones Orbitrap® (Series; AT, Palo Alto, CA, EE.UU.) a través de una interface de electronebulización (ESI) en modo positivo. Se usó nitrógeno como gas secante (350°C, 7 L/min) y gas nebulizador (40 psi). El voltaje del capilar fue de 4000 V, fragmentador 100 y 200 V, *skimmer* 65 V y el voltaje del octopolo 1 fue de 250 V.

- Los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 950 con una velocidad de adquisición de 2 espectros/s.
- Se realizó la corrección de la masa en tiempo real utilizando una solución que incluye purina ($C_5H_4N_4$ a m/z 121,05087) y hexaquis (1*H*, 1*H*, 3*H*-tetrafluoropentoxi)-fosfazeno ($C_{18}H_{18}O_6N_3P_3F_{24}$ a m/z 922,00980).
- La identificación de los compuestos se confirmó usando el modo del cromatograma de iones extraídos (EIC) y medición de masas exactas.
- Se construyó una curva dosis-respuesta de las áreas bajo la curva contra la concentración de OTA conocida a partir del patrón.
- Se calcularon las concentraciones en suero (ng / mL) por interpolación de la ecuación de la recta.
- El ensayo se realizó por duplicado.

7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva: medidas de tendencia central y pruebas estadísticas no paramétricas, que se muestran en la **Tabla 11**.

Para determinar la normalidad de los datos, se aplicó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Se trabajó con un nivel de significancia de $< 5\%$.

Tabla 11. Pruebas no paramétricas utilizadas

Prueba	Descripción
Kruskal Wallis	Para diferencias entre variables: edad y patologías
Test de Wilcoxon	Para diferencias de rango medio entre métodos
U- Mann Whitney	Para diferencias entre grupos: por consumo de alimentos

8.- RESULTADOS

8.1.- RETENCIÓN DE LA MUESTRA

Se evaluaron 161 mujeres que cumplieron con los criterios de inclusión, y que firmaron carta de consentimiento informado, sin embargo, el 5% (n=8) tuvieron que ser excluidas del estudio ya que a pesar de haber aceptado participar, no se concluyó la aplicación del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) (n=2), ó no se logró obtener la muestra sanguínea (n=6).

El estudio se concluyó con el 95% (n=153) de mujeres que completaron satisfactoriamente los dos cuestionarios, la toma de muestra sanguínea y la toma de medidas antropométricas.

8.2.- CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

La edad promedio fue 34.4 ± 21 años de edad con un rango de R= 42 años. La edad mínima fue 18 años y la máxima 60 años.

En cuanto al lugar de origen el 81.6% (n=125) es originario del estado de Michoacán, México, el 16.9% (n=26) es originario de otros estados del país, y sólo un 1.3% (n=2) es de origen extranjero. Cabe destacar que del total de la muestra un 34.6% (n=53) reportó ser originario de la ciudad Morelia, Michoacán (**Tabla 12**).

Referente a los antecedentes Patológicos Personales el 45.0% (n=69) se encontraban clínicamente sanas y el 54.9% (n=84) cursaban con alguna(s) patología, descritas en la **Tabla 13**. Es importante mencionar que el término “clínicamente sana” se refiere a que durante la aplicación del cuestionario de Antecedentes Médicos respondieron negativamente a las patologías mencionadas; sin embargo, no se descarta el hecho de que presentaran procesos bioquímicos patológicos sin diagnóstico médico preciso en el momento del muestreo. Dado el tipo de estudio, no se les dio seguimiento. Cabe puntualizar que el apartado de “cirugías” del mismo cuestionario no se consideró como patología.

Respecto a los antecedentes Heredo-familiares, destacan las siguientes cinco patologías en la población: Primer lugar: Diabetes tipo II (64.1%), segundo lugar: Cáncer (28.3%), Tercer lugar: Hipertensión arterial (26.7%), cuarto lugar: Obesidad (15.8%) y quinto lugar: Insuficiencia renal (8.6%).

Tabla 12. Lugar de origen de las participantes

Ciudad, municipio, localidad	Estado	País	Número de mujeres
Aporo	Michoacán	México	1
Ario de Rosales	Michoacán	México	2
Atecuaro	Michoacán	México	1
Bejucal de Ocampo	Chiapas	México	1
Ciudad Hidalgo	Michoacán	México	2
Charo	Michoacán	México	1
Cherán	Michoacán	México	1
Chucándiro	Michoacán	México	1
Churumuco	Michoacán	México	1
Ciudad de México	Cd. de México	México	6
Coalcomán	Michoacán	México	1
Montería	Córdoba	Colombia	1
Cuitzeo	Michoacán	México	3
Cuto de la Esperanza	Michoacán	México	1
Dolores Hidalgo	Guanajuato	México	1
El paso	Texas	EUA	1
Eduardo Otero Cervantes	Colima	México	1
Epitacio Huerta	Michoacán	México	1
Erongarícuaro	Michoacán	México	1
Gabriel Zamora	Michoacán	México	1
Guadalajara	Jalisco	México	2
Indaparapeo	Michoacán	México	1
Irapuato	Guanajuato	México	2
Jalpa de Méndez	Tabasco	México	1
Jiquilpan	Jalisco	México	1
La Huacana	Michoacán	México	1
Lagunillas	Michoacán	México	2
La Unión	Guerrero	México	1
Lázaro Cárdenas	Michoacán	México	5
León	Guanajuato	México	1
Los Reyes	Michoacán	México	2
Maravatío	Michoacán	México	1
Mazatlán	Sinaloa	México	1
Morelia	Michoacán	México	53
Pastor Ortiz	Michoacán	México	1
Pátzcuaro	Michoacán	México	6
Pénjamo	Guanajuato	México	1
Quiroga	Michoacán	México	9
San Pedro de los Metates	Edo. de México	México	1
Senguio	Michoacán	México	1
Tacambaro	Michoacán	México	3
Tepalcatepec	Michoacán	México	1
Tingüindín	Michoacán	México	2
Tiripetío	Michoacán	México	1
Tlanepantla	Edo. de México	México	1
Toluca	Edo. de México	México	4
Tuzantla	Michoacán	México	1
Uruapan	Michoacán	México	7
Zacapu	Michoacán	México	4
Zamora	Michoacán	México	3
Zihuatanejo	Guerrero	México	1
Zinapécuaro	Michoacán	México	3

Tabla 13. Antecedentes Patológicos Personales

Afección	n*	%**
Accidente cerebrovascular	0	0
Artritis	1	1.1
Asma	1	1.1
Cáncer	1	1.1
Cardiopatías	2	2.3
Diabetes tipo II	18	21.4
Enfermedad Autoinmune	1	1.1
Enfermedad de transmisión sexual	0	0
Enfermedad de vías respiratorias	17	20.2
Enfermedad gastrointestinal	6	7.1
Insuficiencia renal	3	3.5
Osteoporosis	5	5.9
Hipertensión	14	16.6
Hipertiroidismo	2	2.3
Hipotiroidismo	4	4.7
Hepatopatías	2	2.3

*número de personas

** porcentaje en relación a n=84 (total de participantes que cursaban con alguna(s) patología).

En relación a los Indicadores antropométricos: de acuerdo al IMC, el 37.3% de la población tiene sobrepeso, seguido de un 26.8% que posee un IMC adecuado y continúa un 18.3% que presenta Obesidad tipo I como se muestra en la **Tabla 14**.

El peso promedio fue de 67.5 kg y la talla promedio de 1.59m, por lo tanto el Índice de masa corporal promedio fue de 26.6 kg/m², lo que sitúa a nuestra población con sobrepeso, de acuerdo a la clasificación de la OMS (**Tabla 7**).

8.3.- INDICADORES DIETÉTICOS

Los datos arrojados por el Cuestionario de Frecuencia de Alimentos (CFCA) se analizaron por el programa de cómputo del Instituto Nacional de Salud Pública SNUT®.

El consumo promedio de energía fue de: 1724 kilocalorías al día (Kcal/día), con una distribución de macronutrientes como se muestra en la **Figura 9**, donde se destaca el consumo de Hidratos de Carbono (HC) como el sustrato de mayor aporte calórico en la dieta con un 68%, lo que corresponde a 1172 Kcal/día igual a 293 g/día.

Tabla 14. Diagnóstico de IMC de la población

Diagnóstico IMC (OMS 1997)	n*	%**
Desnutrición (bajo peso)	15	9.8
Adecuado	41	26.8
Sobrepeso	57	37.3
Obesidad I	28	18.3
Obesidad II	7	4.6
Obesidad III (mórbida)	5	3.2

*número de personas

** Porcentaje en relación a n=153 (total de muestra)

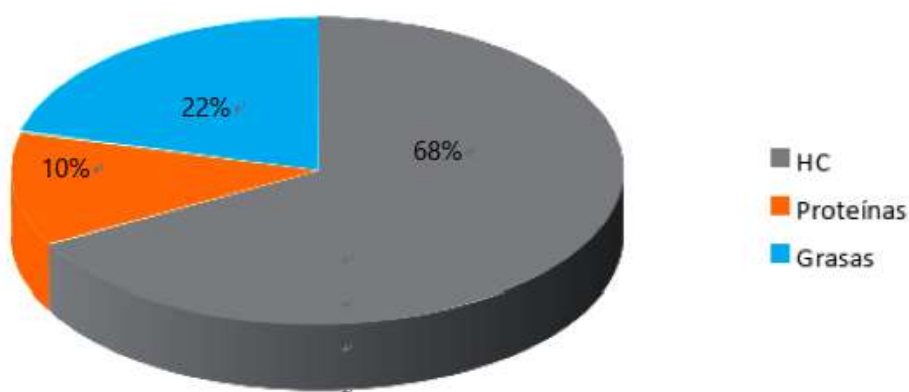


Figura 9. Distribución de consumo de macronutrientes

En la **Figura 10**, podemos observar como fue la distribución de los macronutrientes por grupos de alimentos, siendo el grupo de los cereales el de mayor aporte de HC con un 62%, el resto de los HC provenían de grupos de alimentos como las frutas y los lácteos.

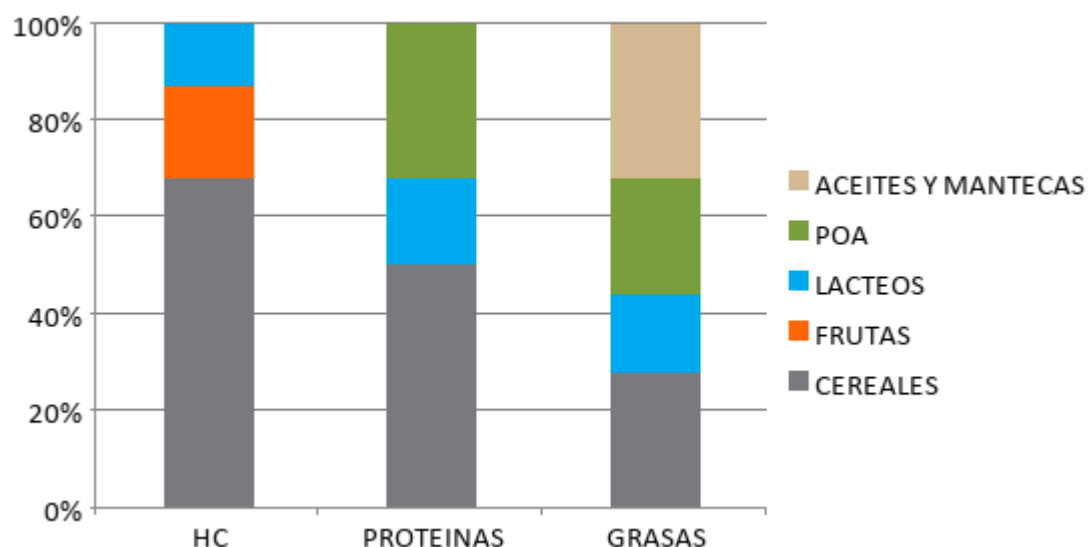


Figura 10. Distribución de macronutrientes por grupo de alimentos

El cereal de mayor consumo es el maíz, siendo la tortilla la principal fuente de éste. Las mujeres consumen en promedio 5.5 tortillas al día (aproximadamente 165g); sin embargo, hubo mujeres que reportaron consumir hasta 500g de tortillas en un día lo equivalente a 17 piezas. El segundo cereal de consumo fue el trigo, seguido por el arroz.

Respecto al consumo de vitaminas y minerales; en la mayoría de las vitaminas del complejo B y de los minerales, se cumplió con la ingesta diaria recomendada (IDR) para población mexicana por la NOM051-SCFI/SSA1-2010 (**Tabla 15**); sin embargo, el consumo de vitamina C se encontró casi a la mitad (35mg/día) de la IDR que es de 60mg/día, esto debido al bajo consumo de frutas y verduras que se registró con un promedio de 1 porción de fruta al día y 2.5 porciones de verdura/día.

Otro aspecto relevante fue el bajo aporte de la dieta de ácidos grasos esenciales poliinsaturados (AGPIs) omega 3 y omega 6, ya que en ninguno se cumplió con la Ingesta de Referencia para la Población (IRP) recomendada por la EFSA-Q-2009-00548 y por el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF, *Scientific Committee on Food*) Europeo, que sugieren un consumo aproximado de 5g de omega-6/día + 1g de omega-3/día para mujeres y el consumo promedio fue de 1.56g/día y 0.3g/día respectivamente como se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 15. Ingesta de vitaminas y minerales en la población

Nutrimento (unidades)	Media	Intervalo	Rango	IDR
Vitamina A (retinol) UI	502	91-1034	943	800
Vitamina B1 (tiamina) mg	1.4	0.2- 4.8	4.6	1.2
Vitamina B2 (riboflavina) mg	1.7	0.3-7.5	7.2	1.2
Vitamina B3 (niacina) mg	18	4-38	34	14
Vitamina B5 (ác. pantoténico) mg	11	4-25	21	5
Vitamina B6 (piridoxina) mg	1.7	0.1-6.6	6.5	1.3
Vitamina B7 (biotina) µg	29.3	4-49	45	30
Vitamina B9 (ác. fólico) µg	506	59-761	702	400
Vitamina B12 (cianocobalamina) µg	3.8	0.3-6.7	6.4	2.4
Vitamina C (ác. ascórbico) mg	35	15-108	93	60
Vitamina D (calciferol) UI	324	71-1029	958	200
Vitamina E (α-tocoferol) mg	6.2	0.5-22	21.5	8
Vitamina K µg	72	3-180	177	65
Calcio mg	1231	200-2519	2319	1000
Fósforo mg	902	104-961	857	700
Hierro mg	16	1-63	62	15
Magnesio mg	493	45-894	849	320

* IDR: ingesta diaria recomendada para población mexicana en general (unidades al día).
NOM051-SCFI/SSA1-2010

Tabla 16. Ingesta de AGPIs en la población

Nutrimento (unidades)	Media	Intervalo	Rango	IRP
Omega 3 (g/día) DHA (ác. decosahexanóico) + EPA (ác. eicosapentanóico) + ALA (ác.α-linolénico)	0.38	0-1.42	1.42	1 g/día
Omega 6 (g/día) LA (ácido linoléico) + ARA (ác. araquidónico)	1.56	0-16.18	16.18	5 g/día

* IRP: ingesta de referencia para la población recomendada por la EFSA y el SCF.

En relación al consumo de café y bebidas alcohólicas, el 37.3% de las mujeres consumen cerveza con un promedio de 1.8 botellas por semana y sólo el 2% consumen vino de mesa con un promedio de 0.7 copas por semana. En cuanto al café más de la mitad de la población, el 52.6%, lo consumen con un promedio de 0.5 tazas al día.

En cuanto al consumo de sal y azúcar, los promedios consumidos fueron: sal: 2000mg/día, que se encuentra dentro del requerimiento diario que es 1 a 3g de sal (NaCl), incluida en la preparación de los alimentos y azúcar (sacarosa): 3 cucharaditas al día (10g), generalmente agregada al café, té o licuados. Un 10% de la población refirió consumir sustitutos de azúcar (sucralosa, espartame, acesulfame K, stevia) sin aporte calórico en la dieta. Por último el CFCA reveló que el 64% de las mujeres no consumen ningún tipo de suplementos vitamínicos y un 88.6% no consumen suplementos de calcio. Es importante destacar que el 78% de las encuestadas considera que su alimentación no ha cambiado en el último año.

8.4.- CONCENTRACIONES DE OTA EN SUERO SANGUÍNEO

8.4.1.- Determinación de OTA en suero sanguíneo por método de ELISA

Se analizaron un total de 153 muestras de suero por método de ELISA y se observó que el 85.6% (n=131) de las muestras de suero fueron positivas para OTA y en un 14.3% (n=22) no se detectó (ND). La concentración promedio de OTA fue de 2.611ng/mL. El intervalo de concentraciones de OTA en suero fue entre 0.0213ng/ml y 6.0982ng/ml. Cabe destacar que el 74.5% (n=114) de las concentraciones en suero de OTA presentaron valores igual o por arriba de 1.0 ng/ml, y un 26.1% (n=40) tuvo valores igual o por arriba de de 3.0 ng/ml (**Tabla 17**). En la comparativa de la **Tabla 18**, se puede apreciar que en general no hubo diferencias significativas entre el promedio de concentración de OTA en suero y las variables de: edad y estado clínico; sin embargo, en el grupo de de 51 a 60 años sí existe una significancia entre pacientes "clínicamente sanas y "con alguna(s) patología.

8.4.2.- Determinación de OTA en suero sanguíneo por método de HPLC MS

Se analizaron un total de 50 muestras por HPLC MS/MS Orbitrap® para determinar la masa exacta (m/z) de OTA. Cabe mencionar que estas muestras ya habían sido analizadas por método de ELISA (**Tabla 19**). Antes de analizar las muestras, se corrió el patrón de OTA a una concentración de 19ppb, resultando:

- OTA: $C_{20}H_{18}O_6N Cl$
- $[MH]^+ = C_{20}H_{19}O_6N Cl = 404.0895 m/z$
- Tiempo de retención (RT) de 6.82 minutos
- Límite de detección (LD) fue de 0.05ng/mL

- Una vez determinado el patrón de OTA, se corrieron 5 estándares a diferentes diluciones para generar a curva de calibración (**Tabla 20**)

Tabla 17. Concentraciones de OTA en suero

OTA (ng/mL)	Mujeres (n=)
ND	22
=LD - <0.03	2
=0.03 - <0.05	2
=0.05 - <0.07	2
=0.07 - <0.09	1
=0.09 - <0.10	1
=0.10 - <0.30	1
=0.30 - <0.50	1
=0.50 - <0.70	2
=0.70 - <0.90	1
=0.90 - <1.00	3
=1.00 - <1.30	5
=1.30 - <1.50	2
=1.50 - <1.70	4
=1.70 - <1.90	4
=1.90 - <2.00	2
=2.00 - <2.30	13
=2.30 - <2.50	7
=2.50 - <2.70	17
=2.70 - <2.90	11
=2.90 - <3.00	10
=3.00 - <3.30	7
=3.30 - <3.50	1
=3.50 - <3.70	5
=3.70 - <3.90	9
=3.90 - <4.00	7
=4.00 - <4.30	3
=4.30 - <4.50	1
=4.50 - <4.70	1
=4.70 - <4.90	2
=4.90 - <5.00	1
=5.00 - <5.30	0
=5.30 - <5.50	0
=5.50 - <5.70	0
=5.70 - <5.90	1
=5.90 - <6.00	1
=6.00 - <7.00	1
Total	153

*ND: no detectable *LD: Límite de detección 0.02ng/mL

Tabla 18. Concentraciones de OTA en suero de acuerdo al estado clínico y al grupo de edad.

ESTADO CLÍNICO	CLÍNICAMENTE SANAS			CON ALGUNA(S) PATOLOGÍAS			Diferencias de promedios	P*
Grupos de edad (años)	Promedio* ng/mL	DE*	n*	Promedio* ng/mL	DE*	n*		
Todos	2.562	1.339	69	2.660	1.176	84	-0.098	0.049
18 a 30	2.549	1.391	50	2.651	1.745	21	-0.102	0.041
31 a 40	2.523	1.204	11	2.577	0.982	24	- 0.054	0.027
41 a 50	2.343	1.318	2	2.301	1.589	18	-0.042	0.021
51 a 60	2.836	1.444	6	3.112	0.391	21	-0.276	0.138*

*DE: desviación estándar

*Promedio de OTA en suero (ng/mL)

*n: número de personas

*P: valor de P, significancia $p \geq 0.05$

Posteriormente se analizaron las muestras, obteniendo los cromatogramas y espectros de masas para cada una (**Figura 11, 12, 13 14**). Resultando un 54% (n=27) positivas a OTA, con una concentración promedio de 1.3531ng/mL.

Tabla 19. Muestras analizadas por ambos métodos

Número de muestra	Registro	concentración OTA por ELISA	Concentración OTA por HPLC
1	SA10	ND	ND
2	SA24	ND	ND
3	SA49	ND	ND
4	SA110	ND	ND
5	WC01	ND	ND
6	SA04	0.0213	ND
7	WC13	0.0348	ND
8	SA112	0.0532	ND
9	SA117	0.0642	0.0543
10	SA28	0.0821	0.0539
11	SA100	0.0953	0.0601
12	SA81	0.1231	ND
13	WC16	0.3465	0.0592
14	WC10	0.5434	ND
15	WC02	0.6743	0.0525
16	SA41	0.9845	ND
17	SA01	1.1236	ND
18	SA98	1.3984	ND
19	WC19	1.5734	0.0688
20	SA120	1.7762	0.0534
21	SA55	1.9032	0.0745
22	SA70	2.0021	ND
23	SA113	2.0862	ND
24	SA37	2.2414	ND
25	SA17	2.4498	0.8421
26	WC07	2.5632	0.9004
27	SA122	2.6742	ND
28	SA106	2.6834	0.0968
29	SA109	2.6991	0.0945
30	SA33	2.7822	0.0984
31	SA124	2.7998	1.8533
32	SA38	3.0926	ND
33	SA99	3.1030	2.6338
34	WC04	3.3876	2.0764
35	SA02	3.5193	2.0653
36	SA92	3.5642	2.0904
37	SA18	3.5781	2.0534
38	WC05	3.6025	2.2838
39	SA38	3.7001	ND
40	SA40	3.8653	ND
41	SA125	3.9552	ND
42	SA34	3.9707	1.8453
43	SA30	4.0033	2.0993
44	SA123	4.2645	1.0616
45	WC21	4.3027	2.0015
46	WC06	4.5600	ND
47	SA108	4.7543	2.9412
48	SA88	4.9032	ND
49	SA63	5.3974	3.3412
50	SA16	6.0982	5.6788

*ND: no detectable

*LD: límite de detección ELISA 0.02ng/mL, HPLC MS 0.05ng/mL

Tabla 20: Estándares de OTA para curva de calibración

STD	V ALICUOTA	V FINAL	[] ng/mL, ppb	ÁREA
1	10 µL	1 mL	0.029	ND
2	30 µL	1 mL	0.054	8638
3	50 µL	1 mL	0.094	33699
4	500 µL	1 mL	0.94	75874
5	1000 µL	1 mL	1.89	184471

*V: volumen

*[]: concentración

*ppb: partes por billón (ng/mL)

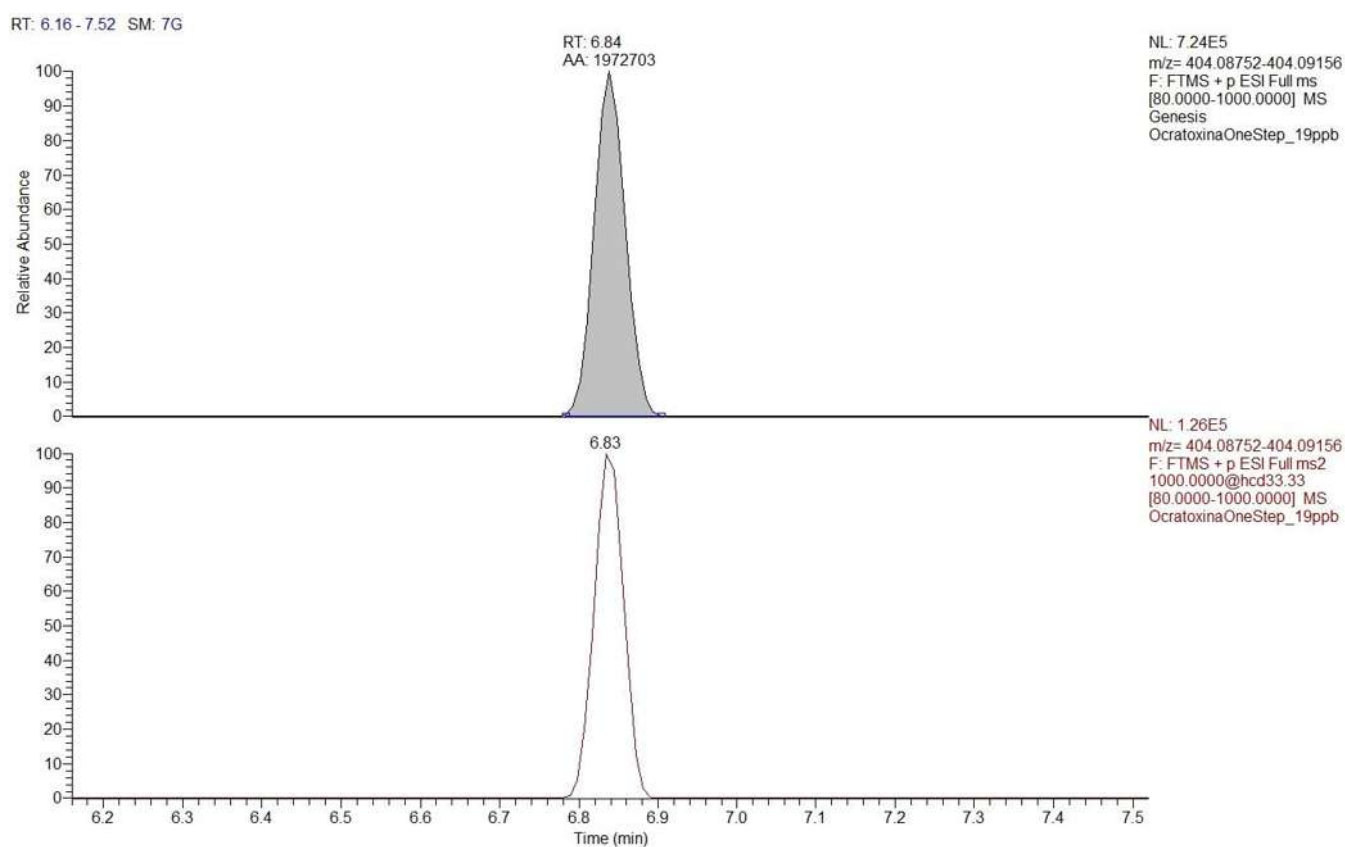


Figura 11. Cromatograma de patrón de OTA a concentración de 19pp

OcratoxinaFullScanR70_19ppb#1130 RT: 6.85 AV: 1 NL: 7.98E5
T: FTMS + p ESI FullRock.ms [80.0000-1000.0000]

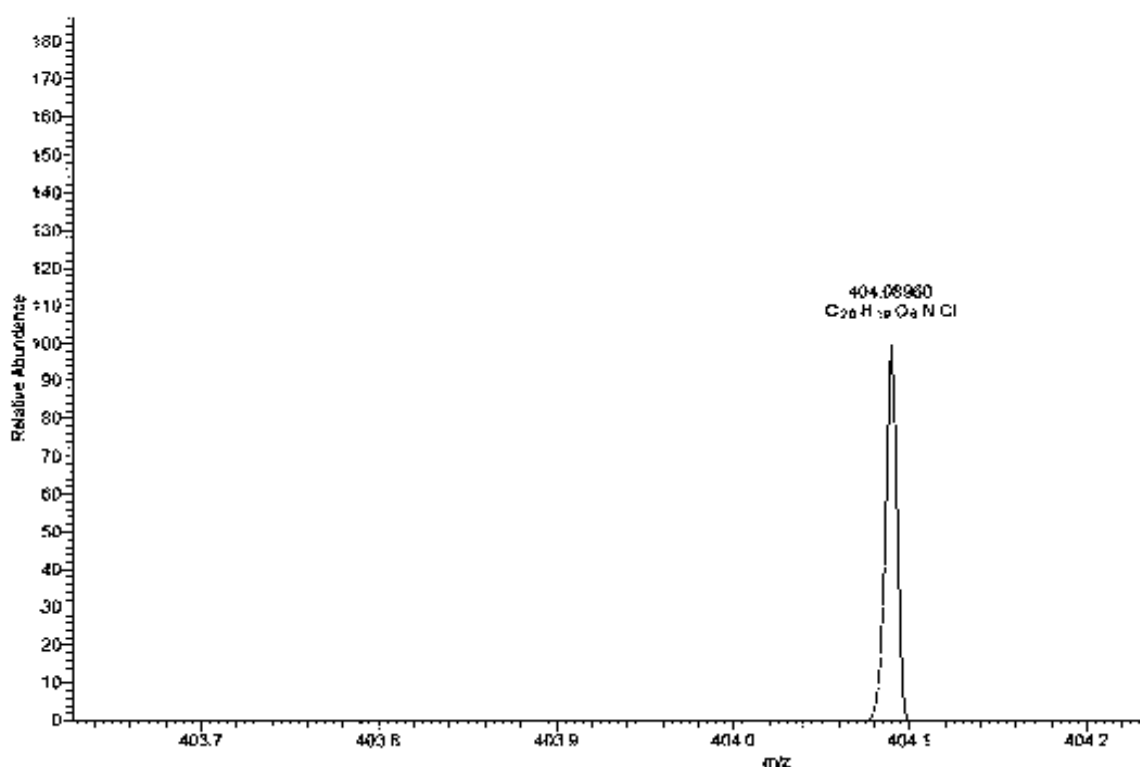


Figura 12. Espectro de masas (m/z) de patrón de OTA a concentración de 19ppb

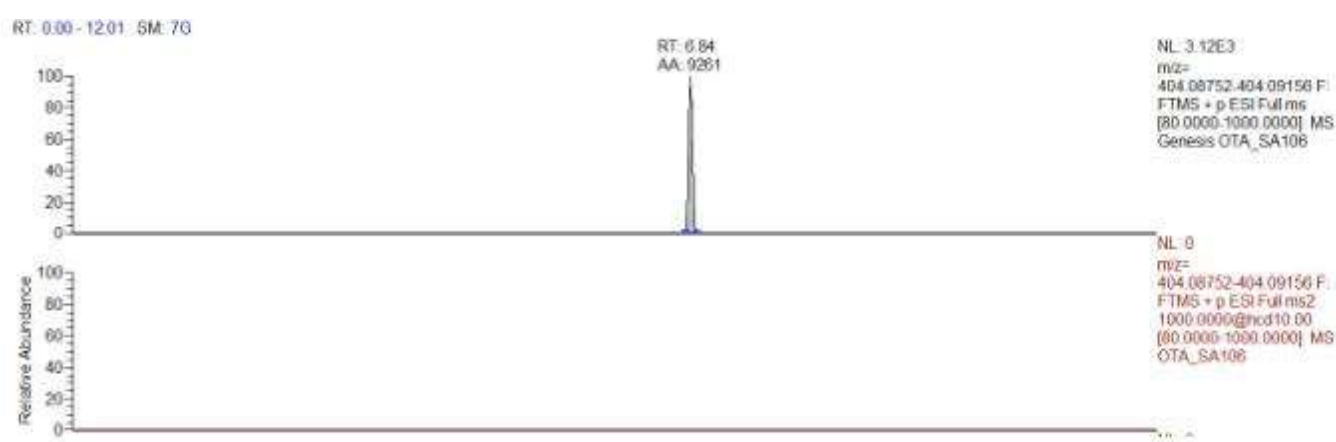


Figura 13. Cromatograma positivo a OTA de muestra SA106

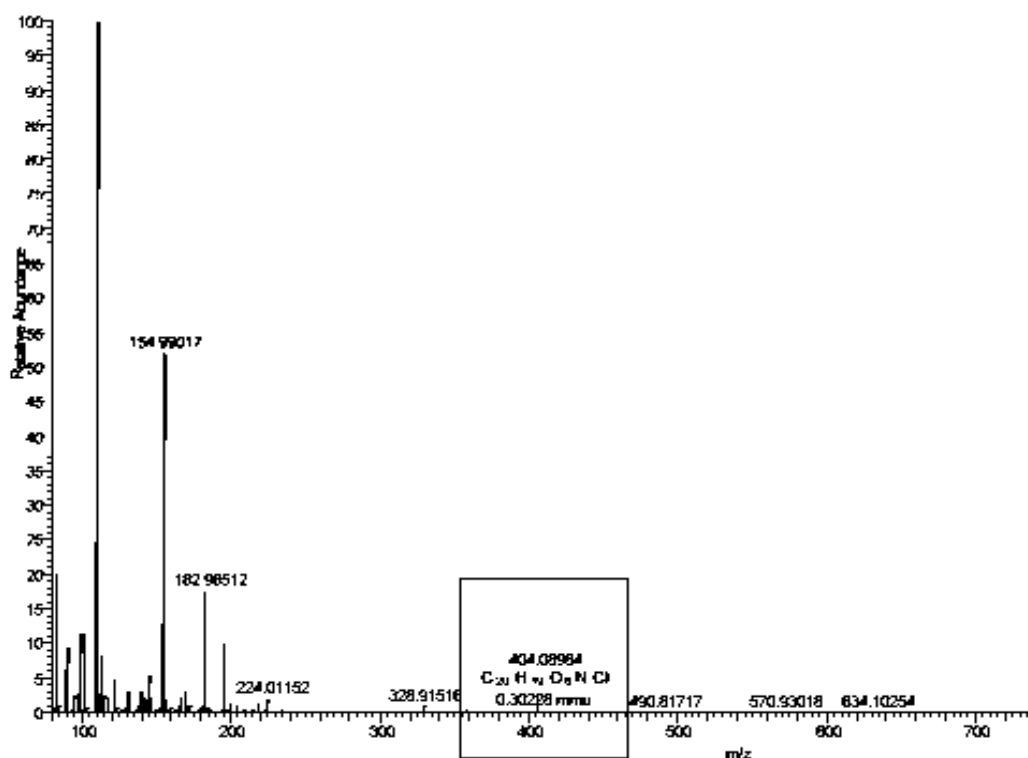


Figura 14. Espectro de masas (m/z) positivo a OTA en la muestra SA106.

Para comparar ambos métodos se utilizó el numero de muestra $n=50$, ya que fueron aquellas que se analizaron por ambos.

Se realizó una prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov en la que se comprueba que los datos siguen una distribución normal (**Tabla 21**). Posteriormente para revisar si existen diferencias significativas entre métodos, se ejecutó una prueba no paramétrica de Wilcoxon.

En la **Tabla 22**, se puede observar que no hubo diferencias significativas entre los valores de concentración de OTA en las 50 muestras. Más si se aprecia en la frecuencia de presencia de OTA (% positivas) que ELISA es 36% mayor que HPLC (**Tabla 21**). Esto significa que por HPLC hubo un mayor número de muestras no detectable (ND) pero con concentraciones mayores que permitió equilibrar las medias y desviaciones estándar, como se comprueba al no haber significancia.

Tabla 21. Comparativa entre métodos

		ELISA	HPLC MS
n		50	50
n positivas		45	27
% positivas		90	54
Mínimo ng/mL		0.0213	0.0525
Máximo ng/mL		6.0982	5.6788
Parámetros normales*	Media	2.520024	1.353119
	Desviación estándar	1.6501535	1.3853675
Kolmogorov-Smirnov Z		.607	1.168
Asimp. Sig. (2 colas)		.854	.130

* El test de distribución es Normal.

Tabla 22. Diferencias entre métodos (Prueba estadística de Wilcoxon)

		n	Rango medio	Suma de rangos
HPLC MS - ELISA	Rangos negativos	27(a)	14.00	378.00
	Rangos positivos	0(b)	.00	.00
	Vinculos	0(c)		
	Total	27		

a HPLC < ELISA

b HPLC > ELISA

c HPLC = ELISA

Test Estadístico (b)

	HPLC - ELISA
Z	-4.541(a)
Asymp. Sig. (2 colas)	.000

a Basado en rangos positivos

b. Test de Wilcoxon (prueba de rangos)

8.5.- ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A OTA MEDIANTE EL CÁLCULO DE INGESTA DIARIA CONTINUA (IDC)

8.5.1.- IDC a partir de concentraciones conocidas de OTA en alimentos

Para estimar la ingesta de OTA a partir de concentraciones conocidas de OTA en alimentos se utilizó la fórmula:

$$IDC = \sum \frac{Ci(Li)}{1000} = \mu\text{g/persona/día}$$

$$\frac{IDC}{PC} = \mu\text{g/kgpc/día}$$

Donde:

- IDC: Ingesta diaria Continua
- Ci: Cantidad consumida del alimento i (g/persona/día)
- Li: Concentración del contaminante en el alimento (μg/kg)
- PC: peso corporal (kg)

Considerando las concentraciones de OTA encontradas en productos de maíz de la ciudad de Morelia, Michoacán (Castillo y Robinson 2016); se calculó la IDC de la población, utilizando el peso promedio de la misma (67.5kg) para poder expresar la IDC de OTA en ng/kg pc/día como se muestra en la **Tabla 23**.

Tabla 23. Estimación de IDC a partir de concentraciones conocidas de OTA en alimentos de Morelia, Mich.

Alimento	Contaminación promedio μg/kg Ci	Consumo promedio g/día/persona Li	Ci*Li/1000	IDC de OTA μg/kgpc/día	IDC de OTA ng/kgpc/día
Granos de maíz	3.415	26.6	0.090		
Cereales para desayuno	3.197	30.5	0.097		
Frituras de maíz	3.219	21.8	0.070		
Harinas de maíz	3.381	165	0.557		
			Σ0.816	0.012	12.08

8.5.2.- IDR a partir del cálculo con fórmula de Klassen

Para estimar la ingesta de OTA a partir de concentraciones de OTA en suero sanguíneo se utilizó la fórmula de Klassen:

$$K_0 = \frac{CLP(Cs)}{A}$$

$$K_0 = \frac{0.99(Cs)}{0.5}$$

Dónde.

- K₀ : IDC de OTA (ng/kg p.c./día).
- CLP: aclaramiento renal (ml/kgpc./día) = 0.99 (constante para personas sanas con peso promedio de 70kg)
- Cs: concentración en suero de la OTA (ng/ml).
- A: biodisponibilidad de la OTA= 0,5 (constante de biodisponibilidad considerada al 50%)
- PC: peso corporal (kg)

Realizando el cálculo con la concentración promedio de OTA determinada para las 153 muestras por ELISA: 2.611ng/mL y utilizando el peso promedio de la población de 67.5 kg, se calculó una IDC en ng/kg pc/ día.

$$IDC = \frac{0.99(2.611)}{0.5}$$

$$IDC = 5.169 \text{ ng/kgpc/día}$$

8.6.- INGESTA DIARIA TOLERABLE (IDT)

Se realizaron las comparaciones de las IDC obtenidas por ambas fórmulas (Klassen y concentraciones conocidas de OTA en alimentos) con la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) que dictan la Reglamentación Internacional (**Tabla 24**).

Los Organismos internacionales fijan un IDT de: 14 ng OTA/kg pc/día (European Food Safety Authority 2006) y 17ng OTA/kg pc/día (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food and Additives 2007) o 5ng/pc/día por SCF.

Tabla 24. Comparativa entre IDC (por ambas fórmulas) e IDT

	IDC	IDT FAO/OMS	IDT EFSA	SCF de la CE
Klassen	5.169	No rebasa	No rebasa	Si rebasa (límitrofe)
OTA en alimentos	12.08	No rebasa	No rebasa (límitrofe)	Si rebasa ampliamente

Se puede apreciar que sí se rebasan los límites internacionales, principalmente al calcular la IDC con la fórmula que considera concentraciones de OTA en alimentos. En nuestro estudio se consideraron concentraciones de OTA en productos de maíz determinadas por Castillo y Robinson 2016, que si bien no considera la concentración en sanguínea, se apega mas a la realidad de la dieta. Sin embargo es importante considerar ambas ya que una podría sobreestimar la ingesta de OTA y la otra podría subestimarla.

En la tabla que se muestra a continuación (**Tabla 25**) se evidencia las diferencias significativas entre ambas formulas, siendo Klassen inferior tanto en el cálculo de IDC como en el porcentaje de mujeres que su IDC rebasa la IDT.

Tabla 25. Diferencias entre fórmulas para IDC y %IDT

Fórmula	IDC promedio ng/kgpc/día	DE	Diferencia	p	% que rebasa IDT*	n	DE	Diferencia	p
Klassen	5.169	4.88	-6.911	3.45*	39.2	60	38.3	-54.2	27.1*
OTA en alimentos	12.08				93.4	143			

*Porcentaje de mujeres que rebasó su IDC la IDT

*p: valor de P, significancia $p > 0.05$

Por último para verificar si la elevada IDC obtenida por la fórmula de concentraciones conocidas de OTA en productos de maíz se relacionaba con la concentración en suero de OTA, se realizaron las comparaciones por grupos de mujeres de acuerdo a la cantidad de piezas de tortilla consumidas al día, encontrando diferencias significativas entre ellos (**Tabla 26**). Siendo el grupo con mayor consumo de tortilla (6 o más piezas/día) el que presentaba valores superiores tanto de: concentraciones de OTA en suero como de IDC.

Tabla 26. Relación entre concentración de OTA en suero y consumo de tortilla

Grupo	n	Concentración OTA en suero ng/mL	Diferencias de promedio	p	IDC ng/pc/ día	Diferencias de promedio	p
Consumo menor 6 tortillas/día	59	2.524	-0.175	0.08*	13.89	-8.27	4.135*
Consumo mayor o igual a 6 tortillas día	94	2.699			5.62		

*n: número de mujeres

*p: valor de p, significancia $p > 0.05$

9.- DISCUSIÓN

La OTA es uno de los contaminantes de mayor prevalencia en los alimentos. Su presencia en el cuerpo humano es debida, principalmente, a la ingestión de pequeñas cantidades que se encuentran en una gran variedad de productos alimenticios. De ahí que los esfuerzos de los investigadores y de las autoridades se hayan centrado en evaluar la incidencia de las micotoxinas en los alimentos para determinar los niveles de contaminación. Sin embargo, las variaciones en la elaboración de alimentos, los niveles de contaminación de los mismos, la cantidad de ingesta de alimentos, la absorción intestinal, la distribución y la excreción de la toxina del cuerpo, conlleva a variaciones individuales de la concentración de OTA en nuestro organismo (Ravelo *et al.*, 2011). Por ello, este estudio tuvo como objetivo general: Estimar la exposición a Ocratoxina A en una población de pacientes ambulatorios del Hospital de la Mujer de Morelia, mediante el análisis de indicadores dietéticos y de concentraciones de OTA en suero sanguíneo; ya que es mediante el uso de ambos (indicadores dietéticos y matrices biológicas) la mejor forma de evaluar el riesgo que representan para el ser humano las micotoxinas (Solfrizzo *et al.*, 2014).

De acuerdo a las características de nuestra muestra, podemos puntualizar que fueron muy similares a las de estudios previos, el número de muestra en nuestro caso fue de 153 mujeres que accedieron a responder dos cuestionarios y a que les extrajera una muestra sanguínea. En mayoría de los artículos revisados, los participantes que donan una muestra de sangre rebasan los 100 (Donhal *et al.*, 2013; Coronel, 2012; Motta, 2009; Quintana *et al.*, 2007; Pérez de Obanos *et al.*, 2001). También es importante mencionar que las participantes eran pacientes ambulatorias del Hospital de la Mujer, siendo éste uno de los principales Hospitales Públicos de la ciudad de Morelia y del estado de Michoacán.

En relación a la edad, pudimos observar que nuestra población es joven con un promedio de edad de 34.4 años por lo tanto una gran número de mujeres se encontraban clínicamente sana o con patologías menores. Sin embargo, fue posible agruparlas por intervalos de edad y estado clínico para revisar diferencias entre ellos (**Tabla 18**). Esto nos lleva a destacar el hecho de que en el grupo de 51 a 60 años sanas y con alguna(s) patología, hubo diferencias significativas en las concentraciones de OTA en suero. Comparando este resultado con la literatura encontramos que coincide con el estudio de Motta (2009) que reporta diferencias en las concentraciones plasmáticas de OTA en

personas mayores a 45 años; más pocos son los estudios que han mostrado una relación entre la edad de los participantes y las concentraciones de OTA en sangre.

Lino *et al.* (2008) estudiaron tres poblaciones: la ciudad de Coímbra y las zonas rurales de Verride y Ereira, Portugal, encontrando que las más altas concentraciones de OTA en plasma se detectaban en las personas mayores de 40 años. Pacin *et al.*, (2008) compararon cuatro grupos de edad (21-30, 31-40, 41-50, 51-60 años) de las ciudades argentinas de Mar del Plata y General Rodríguez, encontrando diferencias significativas en ambos municipios en los grupos de 31 a 40 años y en el grupo de 51 a los 61 años. Coronel *et al.* (2012) estudiaron tres grupos de edad (18 a 29, 30 a 44 y 45 años o más) y los valores medios más altos se encontraron en el grupo de personas mayores de 45 años o más, detectando diferencias significativas entre los tres grupos de edad. Cuanto mayor era la edad de los participantes, mayores eran las concentraciones de OTA en el plasma.

Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Medina *et al.* (2010) donde no se encontraron diferencias entre los grupos de edad. Tampoco con los del estudio de Erkekoglu *et al.* (2010) en Turquía donde se estudió las poblaciones de dos regiones (Mar Negro y Mediterráneo en invierno y verano) cuya edad estaba comprendida entre los 6 a los 80 años, dividiéndola en tres grupos: niños, adultos y edad avanzada. La mayor concentración de OTA se determinó en el verano en los niños que vivían en la región del Mar Negro. Las concentraciones de OTA en niños eran más altas que las encontrados en otros grupos de edad en verano, pero la diferencia no era estadísticamente significativa.

Por tanto, la relación entre la edad de la población y las concentraciones de OTA en sangre no está del todo clara. A pesar de que en nuestro estudio coincide el grupo de edad con concentraciones más altas con el de otros estudios, queda en evidencia que la influencia de otros factores como la presencia de patologías incluso la época del año podría tener mayor relevancia que la edad en sí.

En relación al género; Si bien nuestra población se conformó únicamente de mujeres, al comparar las concentraciones de OTA entre mujeres y varones en el estudio Argentino (Motta, 2009), se pudo observar que solamente en una de las dos provincias hubo diferencias significativas siendo el promedio de concentración plasmática de OTA mayor en hombres (0,4752 ng/mL respecto a 0,2059 ng/ml en mujeres) aunque en ambas poblaciones el porcentaje de los hombres y de las mujeres con valores cuantificables de OTA fueron similares. En Dinamarca, Túnez y Alemania (Thuvander *et al.*, 2001; Ghalí *et*

al., 2009; Cramer, 2015) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. En tanto en España, se encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres con concentraciones plasmáticas promedio más altas en mujeres respecto a hombres cuando se realizó el análisis en los meses de verano (Pérez de Obanos *et al.*, 2001). De manera que, el género parece tampoco ser un factor determinante, sin embargo sería importante ampliar éste estudio en población varonil en México.

Por otro lado, la presencia de OTA en sangre es un posible indicador de patología, dada su relación con enfermedades de sistema renal y urinario, como la Nefropatía Endémica de los Balcanes (BEN), reportada en múltiples estudios donde las concentraciones de OTA tanto en sangre como en orina indican una correlación entre BEN/tumores de vías urinarias (Scott, 2005). Concentraciones en plasma excepcionalmente altas han sido reportados en Croacia (Šegvić *et al.*, 2013), Romania (Dehelean *et al.* 2013), España (Pérez de Obanos, 2001), Italia (Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993), Egipto (Ibrahim *et al.* 2013), y Túnez (Ghalí *et al.* 2009) entre personas sanas y personas con patologías. Si bien en nuestro estudio no era objetivo relacionar OTA con alguna patología en específico, cabe destacar la importancia de ampliar los estudios en éste rubro dada la diferencia significativa entre las mujeres mayores (51 a 60 años) sanas y con enfermedad referidas anteriormente.

En relación a la ingesta de alimentos; sabemos que la OTA ha sido encontrada como contaminante principalmente en cereales. Los resultados del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos de la población del Hospital de la Mujer, mostraron concordancia, al igual que otros estudios, con la clara evidencia del alto consumo de cereales por parte del ser humano. Las diferencias por supuesto se deberán a las características culturales de la población, ya que en la mayoría de las investigaciones europeas el principal cereal de consumo es el trigo mientras que en México es el maíz.

Volviendo al estudio en población Argentina (Motta, 2009) se observó que el 84% de la población consumía diariamente alimentos panificados entre 6 a 10 porciones al día, equiparable al consumo de tortilla que tiene nuestra población de 5.5 piezas/día. La alta frecuencia de ingesta de productos de maíz en las mujeres encuestadas supone que en México, la población está expuesta a OTA. Sin embargo, no son muchos los estudios realizados respecto al nivel de contaminación por OTA en cereales en nuestro país.

Respecto al consumo de café, cerveza y vino que son alimentos también susceptibles a contaminación con OTA, resultó bajo en nuestro estudio, mucho menor al de la población argentina, en gran parte debido a que nuestra población eran mujeres pacientes del Hospital de la Mujer y en aquel estudio los participantes eran de ambos géneros y donadores de sangre; esto significa que muchas de nuestras participantes tenían restringido el consumo de éstas tres bebidas ya fuera por enfermedad, medicación o por lactancia materna. En el caso del vino en particular también cabe mencionar que no es un alimento de elevado consumo en México.

Si bien, no existen en nuestro país datos o estudios dirigidos a conocer el nivel de contaminación por OTA en productos como frutas y verduras, en nuestra población destacó la baja ingesta de éstas; lo que a su vez podría afectar el consumo de antioxidantes en la dieta. Los antioxidantes se han probado en modelos *in vivo* e *in vitro* que son capaces de contrarrestar los efectos deletéreos del consumo crónico de OTA y han confirmado el potencial efectivo que tiene la inclusión en la dieta disminuir la toxicidad de la OTA en nuestro organismo. Tal es el caso de la vitamina C y E que se encontraron por debajo de las recomendaciones para población mexicana (NOM051-SCFI/SSA1-2010). Igualmente los ácidos grasos omega 3 y 6 de los que existe amplia información de su función antioxidante y antiinflamatoria, además de su acción neuro e inmuno protectora, mismas que se ven afectadas por los mecanismos de acción de la OTA, su consumo en nuestra población es muy inferior a las recomendaciones europeas (EFSA-Q-2009-00548 y SCF 2007).

Por otro lado, recordando que la exposición a OTA se ve incrementada debido a la larga vida media en el suero como resultado de su capacidad para unirse a las proteínas plasmáticas (Ravelo *et al.*, 2011), permite que analizar la concentración de OTA en sangre sea una matriz biológica adecuada para la estimar la exposición ésta.

En nuestros resultados, las concentraciones de OTA encontradas en suero, tuvieron una frecuencia elevada (% de muestras positivas). Por el método de ELISA hubo un 85.6% (n=131) de un total de 153 y por HPLC MS un 54% de un total de 50 muestras analizadas anteriormente por ELISA (**Tabla 21**). Los límites de detección fueron de 0.02ng/mL y 0.05ng/mL respectivamente. Cabe mencionar que por ELISA la frecuencia rebasa el 60% planteado en nuestra hipótesis y es coherente con las encontradas en otros estudios revisados.

En la **Tabla 27** se recogen algunos trabajos de concentraciones de OTA en plasma y suero analizadas por diferentes métodos y en distintos países. Los resultados, en general, reflejan altas frecuencias de contaminación en sangre humana por OTA.

La incidencia de contaminación de sangre por OTA se encuentra en el rango de 60 a 100%, diferencias que pueden ser atribuibles a los métodos de detección y cuantificación utilizados, al tipo de población y a los alimentos disponibles contaminados.

La menor presencia de OTA en plasma humano (60%) se encontró en Argentina analizados por HPLC con detector fluorescencia cuyo el límite de detección reportado de 0.019 ng/ml (Pacin *et al.*, 2008). La máxima incidencia de OTA en plasma se fue en el estudio de España (Medina *et al.* 2010) donde en el 100% de las muestras se encontró esta micotoxina. En suero se observa la misma tendencia: Lino *et al.* (2008) con un 100%, utilizando HPLC como método y Quintana *et al.*, (2007) con un 95% usando método de ELISA.

En cuanto a las concentraciones de OTA el valor máximo (74.8 ng/mL) se detectó en Argentina (Pacin *et al.*, 2008); En nuestro trabajo el valor máximo fue de 6.098ng/mL y el mínimo de 0.0213ng/mL con un promedio de 2.52ng/mL mediante el análisis por ELISA y por HPLC MS el máximo fue 5.678ng/mL y el mínimo de 0.0525ng/mL con promedio de 1.35ng/mL. Estas concentraciones son similares a las medias encontradas en países europeos como República Checa 2.03 ng/mL, Italia 3.6 ng/mL, España 1.23 ng/mL, Reino Unido 3.11 ng/mL; Egipto 5.58 ng/mL (Donhal *et al.*, 2013; Solfrizzo *et al.*, 2014; Coronel, 2012; Gilbert, 2001; Ibrahim *et al.*, 2013).

Un punto importante es que las frecuencias de concentraciones de OTA plasmáticas reportadas en Bulgaria (Petkova-Bocharova *et al.*, 2003), país con alta incidencia de BEN, fueron las siguientes: 25% de la población presentaba valores de OTA superiores a 1.0 ng/ml y el 12.5% concentraciones superiores a 3.0 ng/ml. En nuestra población fue incluso mayor la frecuencia ya que el 74.5% tuvo concentraciones igual o mayores a 1.0ng/mL y un 26.1% igual o mayor a 3.0g/mL. Esto indica una pauta para analizar muestras en personas con patologías renales e urinarias y buscar su relación con OTA.

Por último; recordemos que las concentraciones sanguíneas de OTA son el resultado de lo que es absorbido por el organismo menos lo que es eliminado por heces u orina. Con estas concentraciones en sangre es posible estimar la Ingesta Diaria Continua de OTA con

el fundamento de que es esperable que una concentración alta provenga de una ingesta elevada y viceversa.

Tabla 27. Estudios sobre detección de OTA en sangre realizados en la última década en distintos países

País/referencia	Muestra biológica	Frecuencia %**	Método	LD*
España. Coronel 2012	Plasma	98.6	HPLC	0.075
España (Medina <i>et al</i> , 2010)	Plasma	100	HPLC	0.01
Italia (Di Giuseppe <i>et al</i> , 2011)	Plasma	99.1	HPLC con columna de inmuno afinidad	0.025
Chile (Muñoz <i>et al</i> , 2006)	Plasma	70	HPLC	0.1
Argentina (Pacin <i>et al</i> , 2008)	Plasma	60	HPLC	0.019
Portugal (Lino <i>et al</i> , 2008)	Suero	100	HPLC	0.1
Turquía (Erkekoglu <i>et al</i> , 2010)	Suero	81	ELISA	0.025
Costa Rica (Quintana <i>et al</i> , 2007)	Plasma	95	ELISA	0.05
Argentina (Motta 2009)	Plasma	64	HPLC MS	0.025

*LD: límite de detección

** Algunos estudios abarcaron más de una población, se reportó la frecuencia del promedio de ellas.

Sin embargo, establecer la relación entre la ingesta de un alimento y las concentraciones de OTA no ha sido del todo contundente. En múltiples estudios ésta relación no fue significativa (Motta, 2009; Pérez de Obanos *et al*, 2001; Quintana *et al*, 2007; Medina *et al* 2010); mientras que otros si logran establecerla, aunque son los menos. Di Giuseppe *et al*. (2011) observaron que los coeficientes de correlación entre consumo de alimentos y niveles plasmáticos de OTA eran positivos puesto que el elevado consumo de cereales, vino, cerveza, mermelada y miel tuvo diferencias significativas con mayores

concentraciones de OTA en sangre. Muñoz *et al.* (2006) pusieron de manifiesto que la correlación entre concentraciones plasmáticas de OTA y el consumo de cereales donde se detectaba una ligera relación.

En nuestra población el consumo de un alimento y la concentración de OTA en suero sí tuvo diferencias significativas, específicamente en la cantidad de tortilla ingerida al día, es decir que las personas que ingerían 6 o más tortillas al día sí presentaron concentraciones mayores de OTA; por lo tanto la ingesta diaria continua (IDC) promedio superó los límites establecidos de Ingesta Diaria Tolerable (IDT) por el Comité Científico de la Comisión Europea (SCF 2007) de 5ng/kg p.c./día, tal como se reflejó en la **Tabla 24**.

También cabe destacar que hubo diferencias significativas en el cálculo de la ingesta diaria continua entre fórmula de Klassen y concentración de OTA en productos de maíz, siendo muy superior el valor promedio de IDC por concentración de OTA en productos de maíz (12.08ng/kg p.c./día) en relación al IDC promedio obtenido por fórmula de Klassen (5.1ng/kg p.c./día). Así mismo el porcentaje de pacientes que rebasaron la normativa de IDC fue claramente mayor por el primero con 93.4% contra 39.2% por fórmula de Klassen. Coronel (2012) detectó, al igual que en nuestro estudio, diferencias significativas entre la IDC calculada mediante concentraciones conocidas de OTA en alimentos (la media estimada fue mayor) y la IDC estimada en base a concentraciones plasmáticas por fórmula de Klassen (la media estimada fue menor); lo que sugiere que la fórmula de Klassen puede subestimar la ingesta. Más no encontró correlación entre consumo de alimentos potencialmente contaminados por OTA y las concentraciones de OTA en sangre. Además la media de ingesta mayor fue de 1.96 ng/kg p.c./día muy por debajo de la IDT.

Nuestros resultados de estimación de la IDC, difieren a los valores de IDC estimados en la mayoría de los estudios europeos donde son notablemente inferiores a la IDT. Por ejemplo en Italia fue de 1,13 ng/kg p.c./día y en España 1,18 kg p.c./día (Di Giuseppe *et al.* 2011; Pérez de Obanos *et al.*, 2001). Sin embargo, son similares a otras investigaciones como en Argentina donde se estimó una IDC promedio de 5.26ng/kg p.c./día (Motta, 2009) o el caso de un estudio en Francia (Leblanc *et al.*, 2005) donde el 0.9 % de la población de adultos y el 25% de los niños excedía la IDT con más de 18 ng/kg p.c./día.

Finalmente, hay que puntualizar que uno de los principales problemas cuando se evalúa la exposición a micotoxinas es la elección de los métodos empleados para la detección y cuantificación del analito y para la estimación de ingesta. Posiblemente se produzcan

errores por sobreestimación u subestimación tanto de concentraciones como de consumo. Como se apreció en éste estudio, si se calcula la IDC de OTA asumiendo las concentraciones promedio de contaminación de alimentos a nivel mundial el error será mayor que si se estima la exposición a través de concentraciones en alimentos locales; y es por ello que el valor de nuestro trabajo radica en que se consideraron concentraciones de OTA conocidas en alimentos disponibles en Morelia (Castillo y Robinson, 2016), Si bien sólo se tomaron en productos de maíz, el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, demostró la prioridad que tienen éstos en la dieta de la población. Por otro lado, los métodos de ELISA y HPLC MS, utilizados en este trabajo, fueron eficientes en la de cuantificación y detección de OTA sin diferencias significativas entre ellos. Es verdad que por HPLC sólo se analizaron 50 muestras dado el costo que representa hacer estos ensayos, y el límite de detección fue menor al de ELISA, es un método sumamente específico ya que detecta la masa exacta de la molécula sin lugar a error de su presencia o ausencia en la mezcla. ELISA por su parte es un método sensible y específico, aunque cabe mayor posibilidad de sobreestimación por la afinidad que pudieran tener sustancias estructuralmente similares a OTA por los mismos anticuerpos. Por ello se sugiere que para el análisis de contaminantes en matrices biológicas, se lleve a cabo inicialmente un método de "screening" como podía ser ELISA y posteriormente un método confirmatorio como HPLC MS (Abián *et al.*, 2008; Solfrizzo *et al.*, 2011). Otra ventaja de nuestro trabajo fue que tuvimos la oportunidad de aplicar de ambos.

La seguridad alimentaria respecto a la contaminación por micotoxinas es un gran desafío para México, exacerbado por las regulaciones limitadas y la deficiente aplicación de las mismas. Además existen pocos estudios sobre OTA, todos ellos enfocados a su determinación en alimentos más no a exposición humana que representa; lo que hace de nuestro trabajo una primicia de relevancia en el tema.

10.- CONCLUSIONES

1. El 86% de las mujeres pacientes ambulatorias del Hospital de la Mujer de Morelia presenta OTA detectable en sangre y la Ingesta Diaria Continua (IDC) de la población es elevada y preocupante dado que rebasa los límites establecidos por los Organismos Internacionales para Ingesta Diaria Tolerable.
2. Los métodos de detección y cuantificación de OTA: ELISA y HPLC MS, fueron igualmente efectivos en el análisis de muestras de suero sanguíneo; destacando que HPLC MS es el método confirmatorio por excelencia y el oficial de la AOAC cuando se trata de micotoxinas en matrices biológicas.

11.- PERSPECTIVAS

Si bien éste estudio plantea un primer diagnóstico de exposición a OTA en población mexicana, los resultados de esta investigación dan lugar a cuestionamientos que abren una ventana de oportunidad para continuar con el estudio de ésta micotoxina. De manera que se pueda esclarecer su relación con otros factores como género (incluir varones), patologías específicas (insuficiencia renal por ejemplo), estación del año, estados fisiológicos (embarazo), etc. Inclusive considerar medidas preventivas para reducir la contaminación de productos agrícolas con hongos toxigénicos como alternativa para evitar la presencia de las micotoxinas en nuestros alimentos.

Por otro lado, debido al origen natural de la OTA, su persistencia en pequeñas cantidades en alimentos y su estabilidad química hacen casi imposible erradicarla de la dieta, por ello, sin lugar a duda, una dieta inocua y con un adecuado aporte de antioxidantes, favorece la salud previniendo enfermedades potencialmente mortales y permitiendo un adecuado aprovechamiento de los nutrimentos que contrarrestan los efectos tóxicos de sustancias como la OTA, y es en este rubro donde la intervención de profesionales de la del nutrición tiene un lugar provechoso para la población.

12.- REFERENCIAS

1. Abián J, Carrascal M & Gay M. (2008). Introducción a la Espectrometría de Masas para la caracterización de péptidos y proteínas en Proteómica. *Proteómica*; (2): 1-5.
2. Alexandr E, Urusov V, Zherdev V, Petrakova G, Sadykhov Olga, Koroleva V & Dzantiev B. (2015). Rapid Multiple Immunoenzyme Assay of Mycotoxins. *Toxins*; 7(2): 238–254.
3. Arbillaga L, Ezpeleta O & López de Cerain A. (2004). ¿Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica?. *Revista de Toxicología*; 21: 1-7.
4. Aslam M, Beg AE, Blaszkewicz M, Degen GH & Golka K. (2005). Ochratoxin A blood concentration in healthy subjects and bladder cancer cases from Pakistan. *Mykotoxin-Workshop*: 13–15.
5. Assaf H, Betbeder AM, Creppy E, Pallardy M & Azouri H. (2004). Ochratoxin A levels in human plasma and foods in Lebanon. *Human & Experimental Toxicology*; 23:495–501.
6. Battacone G, Nudda A & Pulina G. (2010). Effects of Ochratoxin A on Livestock Production. *Toxins*; 2(7): 1796–1824.
7. Bauer J & Gareis M. (1987). Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette (Ochratoxin A in the food-chain). *Journal of Veterinary Medicine Series B*; 34: 613 -627.
8. Bellver S, Fernández-Franzón M, Ruiz MJ & García AJ. (2014). Presence of Ochratoxin A (OTA) Mycotoxin in Alcoholic Drinks from Southern European Countries: Wine and Beer. *Journal of Agricultural and food chemistry*; 62: 7643-7651.
9. Biró K, Solti L, Barna-Vetró I, Bagó G, Glávits R, Szabó E & Fink-Gremmels J. (2002). Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathology*; 31:141– 148.
10. Breitholtz-Emanuelsson A, Olsen M, Oskarsson A, Palminger I & Hult K. (1993). Ochratoxin A in Cow's milk and in Human milk with corresponding human blood samples. *Journal of the AOAC International*; 76: 842-846.
11. Brewer J, Thrasher J, Straus D, Madison R & Hooper D. (2013). Detection of Mycotoxins in Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Toxins*; 5 (4):605-617.
12. Carreño Y, Mercado M, Trespalacios A & Otero M. (2009). Comparación de la prueba de antígenos fecales (Elisa) y test de aliento de la urea frente a histología para el diagnóstico de *Helicobacter pylori*: Revisión sistemática de la literatura. *Revista Colombiana de Gastroenterología*; 24 (4): 1.
13. Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G & Chernozemsky I. (1988). *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*. Lyon: IARC Science Publications; 115: 105.
14. Castillo W & Robinson V. (2016) Tesis: Determinación de Ocratoxina A en café, cerveza y maíz en Morelia, Michoacán por un método de ELISA. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
15. Chit Shing & Hani E. (2016). Maternal-Fetal Cancer Risk Assessment of Ochratoxin A during Pregnancy. *Toxins*; 8: 87.
16. Chung-Hsuan W. (2008). Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. *Analytical Chimical Acta*; 624: 16.

17. CODEX FAO/OMS. (2006). Comité del CODEX sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/gsfa/es/>. Fecha de consulta noviembre 2015.
18. Comisión Europea (CE). (2007). Reglamento (CE) Nórdico. Diario Oficial de la Unión Europea; 36 (4): 5.
19. Coronel M. (2012). Risk analysis of Ochratoxin A in the frame of food safety. Exposure assessment. Food and Chemical Toxicology; 43: 325-329.
20. Cramer B, Osteresch B, Muñoz K, Hillmann H, Sibrowski W & Hans-Ulrich H. (2015). Biomonitoring using dried blood spots: Detection of ochratoxin A and its degradation product 2'R-ochratoxin A in blood from coffee drinkers. Molecular & Nutrition Food Research;59(9):1837-43.
21. Creppy E (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters; 127: 19-28.
22. Czakai K, Muller K, Mosesso P, Gaetano P, Schulze M, Antje G & Debasis P. (2011). Perturbation of Mitosis through Inhibition of Histone Acetyltransferases: The Key to Ochratoxin A Toxicity and Carcinogenicity?. Toxicological Sciences; 122(2): 317–329.
23. Dehelean C, Poiana M, Radulov A, Cimpean A, Bordean D, Tulcan C & Pop G. (2013). The occurrence of mycotoxins in wheat from western Romania and histopathological impact as effect of feed intake. Chemistry Center Journal; 7: 99.
24. Dehgham P, Pakshir K, Rafiei H, Chadeganipour M & Akbari M. (2014). Prevalence of Ochratoxin A in Human Milk in the Khorrambid Town, Fars Province, South of Iran. Microbiology; 7(7): 1-4.
25. Di Giuseppe R, Bertuzzi T, Rossi F, Rastelli S, Mulazzi A & Capraro J (2011). Plasma ochratoxin A levels, food consumption, and risk biomarkers of a representative sample of men and women from the molise region in Italy. European Journal of Nutrition; 51(7): 851-860.
26. Dohnal V, Dvůrák V, Malír F, Ostry V & Roubal T. (2013). A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic. Food and Chemical Toxicology; 62: 427-431.
27. Doi K & Uetsuka K. (2011). Mechanisms of Mycotoxin-Induced Neurotoxicity through Oxidative Stress-Associated Pathways. International Journal of Molecular Science; 12(8): 5213–5237.
28. Dorrenhaus A, Flieger K, Golka H, Schulze H & Dagger M. (2000). Induction of Unscheduled DNA Synthesis in Primary Human Urothelial Cells by the Mycotoxin Ochratoxin A. Toxicological Sciences; 53: 271–277.
29. Drejer I, Romme R & Have P. (2014). Occurrence of Pre- and Post-Harvest Mycotoxins and Other Secondary Metabolites in Danish Maize Silage. Toxins; 6(8): 2256–2269.
30. Drunday V & Pacin A. (2013). Occurrence of Ochratoxin A in coffee beans, ground roasted coffee and soluble. Food Control; 30: 675-678.
31. Duarte SC, Peña A, Lino CM. (2009). A review on Ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. Food Microbiology; 2 (27): 187-198.
32. Dutra E, Cardoso S & Nascimento J. (2002). Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a

- hr/>
- saúde humana. *Revista Saúde Pública*;36 (3): .319-323.
33. EFSA. (2010). Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to ochratoxin A in food. Disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/146>. Fecha de consulta: marzo 2016.
 34. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2012). Disponible en: <http://ensanut.insp.mx/>. Fecha de consulta: 04 agosto 2015.
 35. Erkekoglu P, Sabuncuoğlu S, Aydın S, Şahin G & Giray B. (2010).Determination of seasonal variations in serum ochratoxin A levels in healthy population living in some regions of Turkey by enzyme-linked immunosorbent assay. *Toxicon*; 55(3): 507-513.
 36. Espinosa N, Garrido E, Ramírez M & Pérez M. (2002). Monitoreo de seis micotoxinas en granos de maíz, trigo, sorgo y cacahuate en chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. Disponible en: <http://www.unach.mx/buscar?searchword=boletin&searchphrase=all>. Fecha de consulta: enero 2016.
 37. Fahmy N, Woo M, Alameldin M, MacDonald K, Lee W, Goneau B, Cadieux P & Pautler S. (2014). Ochratoxin A is detectable in renal and testicular tumours. *Journal of Applied Toxicology*; 9: 91-96.
 38. Fazekas B, Tar A, Kovacs M. (2005). Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*; 53:35-44.
 39. Felizardo R & Camara N (2013). Hepatocellular carcinoma and food contamination: Aflatoxins and ochratoxin A as great prompther. *World J Gastroenterol*;19(24): 3723-3725.
 40. Flores CM, Hernández-Portilla LB & Vázquez J. (2006). Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. *Técnica Pecuaria México*;44(2):247-25.
 41. Franco H, Vega A, Reyes S, De León J & Bonilla A. (2013). Niveles de Ocratoxina A y Aflatoxinas totales en cafés de exportación de Panamá; por un mé;todo de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*: 6 (1): 42-49.
 42. Frank R & Hargreaves R. (2003). Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nature Reviews*; 2: 566-580.
 43. Gauchi JP & Leblanc JC. (2002). Quantitative assessment of exposure to the mycotoxin ochratoxin A in food. *Risk Analysis*; 22: 219-34.
 44. Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Wilflingsede D, Pollack V, Dander M & Schramek H. (2000). Ochratoxin A Induces JNK Activation and Apoptosis in MDCK-C7 Cells at Nanomolar Concentrations. *Toxicological Sciences*; 53: 27-277.
 45. Ghali R, Hmaissia-Khlifa K, Ghorbel H, Maaroufi K & Hedili A. (2009). HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods. *Food Control*; 20(8), 716-720.
 46. Gilbert J, Brereton P & MacDonald S. (2001). Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Additives and Contaminants*; 18:1088–1093.
 47. Gimeno E. (2013). Sinergismo entre micotoxinas ¿Mito o realidad?. Disponible en: <http://www.ergomix.com>. (Micotoxinas en Español). Fecha de consulta: febrero 2017.

48. Gottschalk C, & Biermaier B, Gross M, Schwaiger K & Gareis M. (2017). Ochratoxin A in brewer's yeast used as food supplement. *Mycotoxin Research*; 2:1–5.
49. Hagelberg S, Hult K & Fuchs R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma. *Journal of Applied Toxicology*; 9 (2):91-6.
50. Houghton L, Lynch B, Magnuson B & Nestmann E. (2012). A reassessment of risk associated with dietary intake of ochratoxin A based on a lifetime exposure model. *Critical Toxicology*; 42(2): 147-168.
51. Halbin J, Lattanzio V, Djeneba O, Brou K, Visconti A. (2014). Assessment of Mycotoxin Exposure in Côte d'Ivoire (Ivory Coast) Through Multi-Biomarker Analysis and Possible Correlation with Food Consumption Patterns. *Toxicology*; 21(3): 248–257.
52. Hans P, Van E, Ronald C, Schothorst M & Jonker A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 389 (1): 147–157.
53. Hassen W, Abid S, Achour A, Creppy E & Bacha H. (2004). Ochratoxin A and 2-microglobulinuria in healthy individuals and in chronic interstitial nephropathy patients in the centre of Tunisia: A hot spot of ochratoxin A exposure. *Toxicology*; 199:185-193.
54. Hauschild JP, Wapelhorst E & Müller J. (2007). Mass spectra measured by a fully integrated MEMS mass spectrometer. *International Journal of Mass Spectrometry*; 264: 53-60.
55. Hodgson DR, Whittaker R, Herath A, Amakye D & Clak G. (2009). Biomarkers in oncology drug development. *Molecular Oncology*; 3: 24-32.
56. Huybrechts B & Tangni E. (2010). Evaluation of immunoassay kits for ochratoxin A determination in cereals. *CODE-CERVA: Veterinaty and Agrochemical Research Centre*; 5: 65-120
57. Ibrahim A, Zaghloul H, Farid A & Badria A. (2013). Case Report Evidence of Relationships between Hepatocellular Carcinoma and Ochratoxicosis. *Plos one*; 8(8): e71423.
58. Jaramillo M. (2002). Interacciones Micotoxinas-Nutrientes Hallazgos Relevantes. *Nutrición-Micotoxicología Universidad Central de Venezuela*. Disponible en: <http://www.micotoxinas.com.br/Boletim30.pdf>. Fecha de consulta: febrero 2017.
59. Jaramillo M. (2006). Aditividad, Sinergismo y Antagonismo entre micotoxinas y sus efectos en pollos de engorde. Disponible en: <http://www.ergomix.com>. (Micotoxinas en Español). Fecha de consulta: febrero 2017.
60. Jayatilake N, Mendis S, Maheepala P & Menta F. (2013). Chronic kidney disease of uncertain aetiology: prevalence and causative factors in a developing country. *BMC Nephrology*; 14: 180.
61. Jonsyn FE, Maxwell SM & Hendrickse RG. (1995). Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathology*; 131: 121-126.
62. Kamp HG, Eisenbrand G, Janzowski C, Kiossev J, Latendresse JR, Schlatter J & Turesky R. (2005). Ochratoxin a induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats. *Molecular Nutrition & Food Research*; 49: 1160-1167.
63. Keller L, Pereyra C, Cavaglieri L & Rosa C. (2012). Fungi and Mycotoxins from Pre- and Poststorage Brewer's Grain Intended for Bovine Intensive Rearing. *ISRN Veterinary Science*; 1: 6.

64. Khan S, Martin M, Bartsch H & Rahimtula AD. (1989). Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. *Biochemistry Pharmacology*; 38(1):67-72.
65. Kuiper-Goodman T, Hilts C, Billiard S, Kiparissis Y, Richard I & Hayward S. (2010). Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy. *Food Additives Contaminants*; 27(2):212-40.
66. Leblanc J, Tard A, Volatier J & Verger P. (2005). Estimated dietary exposure to principal food mycotoxins from The First French Total Diet Study. *Food Additives & Contaminants*; 22:652-72.
67. Leiko B, Braga A, Ribeiro P, Machinski A & Machinski M. (2005). Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in maize-based food products. *Brazilian Journal of Microbiology*; 36 (3): 1-5.
68. Li S, Marquardt RR, Frohlich AA, Vitti TG & Crow G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 145: 82-90.
69. Lino C, Baeta ML, Henri M, Dinis A, Pena A & Silveira M (2008). Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. *Food and Chemical Toxicology*; 46(3), 879-885.
70. López de Cerain A, Jiménez AM, Ezpeleta O & Bello J. (2000). Efectos tóxicos de la Ocratoxina. *Revista Toxicología*; 17: 61-69.
71. Mantle P. (2015). Contribution of Organ Vasculature in Rat Renal Analysis for Ochratoxin A: Relevance to Toxicology of Nephrotoxins. *Toxins*; 7(4), 1005-1017.
72. Martínez H, Hernández S, Reyes C & Vázquez G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz en México: Problemática y Perspectivas. *Revista mexicana de Fitopatología*; 31 (2): 1-3.
73. Marín S, Bellí N, Ramos AJ & Sanchis V. (2005). Presencia de Ocratoxina A en vinos y derivados de uva. *Alimentación Nutrición y Salud*; 3 (12): 113-8.
74. Medina A, Mateo E, Roig RJ, Blanquer A & Jiménez M. (2010). Ochratoxin A levels in the plasma of healthy blood donors from Valencia and estimation of exposure degree: Comparison with previous national Spanish data. *Food Additives & Contaminants: Part A*; 27(9), 1273-1284.
75. Medina JC, Muñoz J & Romero M. (2010). Problemas en la cuantificación de micotoxinas y niveles de contaminación en México. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-ab482s/AB482S14.htm>. Fecha de consulta 03 junio 2015.
76. Micco C, Ambuzzi MA, Miraglia M, Brevi C, Onori R, Benelli L.(1991). Contamination of human milk with ochratoxin A. *IARC Science Publications*; 115:105.
77. Minervini F, Giannoccaro A, Nicassio M, Panzarini G & Lacalandra G. (2013). First Evidence of Placental Transfer of Ochratoxin A in Horses. *Toxins*; 5, 84-92
78. Moragas M. (2007). Recopilación de normas Microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. Disponible en <http://www.conycal.es/.../recopilacion-de-normas-microbiologicas-de-los-alimentos/>. Fecha de consulta: noviembre 2015.
79. Motta E. (2009). Tesis Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz. Universidad de Buenos Aires.
80. Muñoz K, Cramer B, Dopstadt J, Humpf H & Degen G. (2017). Evidence of ochratoxin A conjugates in

- urine samples from infants and adults. *Mycotoxin Research*; 33:39–47.
81. Muñoz K, Vega M, Rios G, Muñoz S & Madariaga R.(2006). Preliminary study of ochratoxin A in human plasma in agricultural zones of Chile and its relation to food consumption. *Food and Chemical Toxicology*; 44(11): 1884-1889.
82. Méndez-Albores A & Moreno E. (2009). Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. Disponible en: <http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/online/619-Albores%20Micotoxinas.pdf>. Fecha de consulta: diciembre 2015.
83. Ostry V, Malir F & Ruprich J. (2013). Producers and Important Dietary Sources of Ochratoxin A and Citrinin. *ISSN Toxins*; 5: 1574-1586.
84. Pacin A, Ciancio B, Motta E, Resnik S, Villa D & Olsen M. (2008). Survey of Argentinean human plasma for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants: Part A*; 25(5): 635- 641.
85. Peraica M , Dubravka F, Domijan A, Ivc D & Cvjetkovic D. (2010). Ochratoxin A Contamination of Food from Croatia. *Toxins*; 2(8): 2098–210.
86. Petkova-Bocharova T, Chernozemsky & Castegnaro M. Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Additives & Contaminants*; 5: 299-301.
87. Pfohl-Leskowicz A & Manderville RA. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research*; 5:61-99.
88. Pineda A, Flores CM, Hernández-Portilla LB & Urzua M. (2012) Métodos de análisis de micotoxinas en granos y alimentos de uso pecuario. Disponible en: <http://www.avicultura.mx>. Fecha de consulta: mayo 2016.
89. Prado G, Silva M, Pinheiro C, Oliveira L, Veloso T & Ferreira L.(2003). Ochratoxin A Determination in beer by immunoaffinity column clean up and high performance liquid chromatography. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*; 23: 1678- 1697.
90. Página Oficial de la Food and Agriculture Organization of United Nations. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s04.htm>. Fecha de consulta: octubre 2015.
91. Página Oficial de la Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>. Fecha de consulta: octubre 2015.
92. Pérez de Obanos A, López de Ceraín A, Jiménez AM, González E & Bello J. (2001). Ocratoxina A en plasma humano: nuevos datos de exposición en España. *Revista Toxicología*; 18: 19-23
93. Quintana E. Guzmán Florencia, Antillón G & Chaves J. (2007). Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*; 57 (2): 168-171.
94. Ravelo A, Rubio C, Gutiérrez A.J & Hardisson A. (2011). La Ocratoxina A en alimentos de consumo humano. *Nutrición Hospitalaria*; 26 (6): 1215-1226.
95. Reljic Z, Zlatovic M, Savic-Radojevic A, Pekmezovic T, Djukanovic L, Matic M, Pljesa-Ercegovac M, Mimic-Oka J, Opsenica D & Simic T. (2014). Increased Susceptibility to Balkan Endemic Nephropathy in Carriers of Common GSTA1 (*A/*B) Polymorphism Linked with the Catalytic Role of GSTA1 in

- Ochratoxin A Biotransformation? Serbian Case Control Study and In Silico Analysis. *ISSN Toxins*; 6: 2348-2362.
96. Reyes-Velázquez W, Espinoza V, Rojo F, Jiménez-Plasencia C, Palacios E, Hernández-Góbora J & Ramírez A. (2008). Incidencia de hongos y micotoxinas en el ensilaje de maíz en el estado de Jalisco, México. *Revista Iberoamericana de Micología*; 25: 182-185.
97. Robledo M, Marín S & Ramos A. (2001). Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*; 18:141-144.
98. SCOOP Scientific Cooperation Task 3.2.7 of the European Commission. (2002). Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_contaminants_catalogue_ochratoxin. Fecha de consulta: febrero 2016.
99. Scott PM. (2005). Biomarkers of human exposure to ochratoxin A. *Food Additives & Contaminants*; 22 (1):99-107.
100. Šegvic M, Rašić D & Peraica M. (2013). Deleterious Effects of Mycotoxin Combinations Involving Ochratoxin A. *Toxins*; 5(11): 1965–1987.
101. Serrano F. (2012). Tesis: Determinación de pesticidas en mora por cromatografía líquida y muestreo por SPME. Universidad Industrial de Santander: 14.
102. Shephard GS.(2008). Impact of mycotoxins on human health in developing countries. *Food Additives and Contaminants*; 25(2): 146-151.
103. Sierra A. (2004). Tesis: Estudio de la contaminación por micotoxinas en maíz (*Zea Mays*) de tres variedades cosechadas en el estado de Jalisco. Universidad de Guadalajara: 4-17.
104. Solfrizzo M, Gambacorta L, Powers S & Visconti A. (2011). Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, deoxynivalenol, deepoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B1 in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*;401(9):2831- 2841.
105. Solfrizzo M, Gambacorta L & Visconti A. (2014). Assessment of Multi-Mycotoxin Exposure in Southern Italy by Urinary Multi-Biomarker Determination. *Toxins*; 6: 523-538
106. Soriano JM. (2007). Micotoxinas en alimentos. Valencia, España: Díaz de Santos: 424.
107. Sorrenti V, Di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M & Galvano F. (2013). Toxicity of Ochratoxin A and Its Modulation by Antioxidants: A Review. *Toxins*;5(10):1742-1766
108. Stoycho D (2010). Studies on Carcinogenic and Toxic Effects of Ochratoxin A in Chicks. *ISSN Toxins*; 2: 649-664.
109. Studer-Rohr I, Dietrich DR & Schlatter C. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of Ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* ; 74: 499-510
110. Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A & Enghardt-Barbieri H. (2001). Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. *Food Chemistry Toxicology*;39(12):11455.

111. Tittlemier SA, Varga S, Scott PM & Krska R. (2011). Sampling of cereals and cereal-based foods for the determination of ochratoxin A: an overview. *Food Additives and Contaminants*; 28 (6): 775-785.
112. Turcotte AM, Mantle P & Tague B. (2013). Analysis of cocoa products for ochratoxin and aflatoxins. *Mycotoxin Research*; 29:193-201.
113. Valcárcel M & Gómez-Hens A. (2003). Hibridación instrumental en técnicas analíticas de separación. Barcelona, España; Editorial Reverté: 725.
114. Villalpando S & Rivera A. (2007). Manual de procedimientos para proyectos de nutrición en México. Instituto Nacional de Salud Pública. Disponible en: http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/proy_nutricion.pdf. Fecha de consulta: enero 2016.
115. Wyatt RD. (1991). Mycotoxins and Animal Foods. *Poultry*: 553-654.
116. Xiang L, Zhiliang X & Xin L. (2009) Comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry for metabonomics: Biomarker discovery for diabetes mellitus. *Analytical Chemical Acta*; 633: 257-262.
117. Xiao H, Madhyastha S, Marquardt RR, Li S, Vodela JK, Frohlich A & Kemppainen B. (2006). Toxicity of Ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol*; 137: 182-92.
118. Yordanova P, Karmaus W, Tsoleva S & Dimitrov P. (2010). Ochratoxin A and β 2-Microglobulin in BEN Patients and Controls. *Toxins*; 2: 780-792.
119. Zhang A, Feng L, Wang Y, He C & Wang X. (2011). Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*; 22(11): 1723-1728.
120. Zhu L, Tao Y, Xiaozhe Q, Jing G, Kunlun H, Xiaoyun H, Haoshu L & Wentao X. (2016). Article Limited Link between Oxidative Stress and Ochratoxin A, Induced Renal Injury in an Acute Toxicity Rat Model. *Toxins*; 8: 373.

III. ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE ACEPTACIÓN DEL HOSPITAL DE LA MUJER, MICHOACÁN



Gobierno del Estado
de Michoacán de Ocampo

Dependencia	SECRETARÍA DE SALUD
	HOSPITAL DE LA MUJER
Sub-dependencia	
Oficina	ENSEÑANZA E INVESTIGACION
No. de oficio	090 /
Expediente	
Asunto:	ASUNTO: CARTA DE ACEPTACION.

Morelia, Mich. a 11 de Mayo de 2016

M.C.M. DANIEL ZALAPA MARTINEZ
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
"DR. IGNACION CHAVEZ"

Por este conducto me permito informar a usted, que la **L.N. SARA ALEJANDRA DIAZ TENA** estudiante de la Maestría en Ciencias de la Salud, ha sido aceptada para realizar su Protocolo de Investigación: "EXPOSICION A OCRATOXINA A EN UNA POBLACION DE PACIENTES AMBULATORIAS DEL HOSPITAL DE LA MUJER, MICHOACAN" en este Hospital, ya que se han cubierto los requisitos correspondientes al Protocolo de Investigación.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE
COORDINADOR DE INVESTIGACION

DR. VICTOR LLANOS ARRIAGA



C.c.p.- Archivo / Minutario.
VLLA/kaja*

Al contestar este oficio, cítense los datos contenidos en el cuadro del ángulo superior derecho

Michoacán #EstáenTi

ANEXO 2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo: “Exposición a Ocratoxina A en una población de pacientes ambulatorios del Hospital de la Mujer de Morelia, Michoacán”.

Sede donde se realizará el estudio: Hospital de la Mujer de Morelia, Michoacán.

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Siéntase en absoluta libertad de preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

1.- OBJETIVO DEL ESTUDIO: Evaluar la exposición a Ocratoxina A en una población de pacientes ambulatorios del Hospital de la Mujer de Morelia, mediante el análisis de indicadores dietéticos y de concentraciones en suero sanguíneo.

2.- PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO: En caso de que acepte participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, al inicio del estudio se le aplicarán dos cuestionarios a manera de entrevista, el primero es para recabar información demográfica y antecedentes médicos y el segundo es un Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos. En éste se le preguntará sobre la frecuencia con que consume algunos alimentos. También se le tomarán medidas antropométricas: Peso y talla. Por último se le extraerán 2.5mL de sangre, para posteriormente poder determinar concentración de OTA en plasma.

3.- RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO: Este estudio consta de las siguientes fases: La primera implica: Llenado de cuestionarios, la segunda: la extracción de 2.5 ml de sangre de la vena y la tercera: toma de medidas antropométricas. Posterior a la toma de sangre se puede presentar: ligero dolor, adormecimiento de la mano por unos minutos, sensación de mareo, morete, sangrado e infección en casos muy raros.

4.- ENTREGA DE RESULTADOS: Una vez que se tengan los análisis estadísticos, se les darán a conocer los resultados de su muestra y Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos de manera individual a principios del año 2017.

5.- ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- No tendrá que hacer gasto alguno para el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida en el anonimato por el grupo de investigadores.

- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

6.- DATOS DEL INVESTIGADOR Y LA INSTITUCIÓN:

- Responsable: Licenciada en Nutrición: Sara Alejandra Díaz Tena. Correo electrónico: tenadiazale@gmail.com. Tel. móvil: (443) 2148424
- Profesor-investigador titular: D. en C. Virginia Angélica Robinson Fuentes. Correo electrónico: vrobinsonf@hotmail.com. Tel. fijo: (443) 3120014 y Ext. 235.
- Domicilio: Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”: Av. Dr. Rafael Carrillo Esquina Dr. Salvador González Herrejón S/N. Bosque Cuauhtémoc. Colonia Centro. CP: 58020. Morelia, Michoacán.

7.- CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta carta de consentimiento.

Firma del participante

Fecha

Testigo 1 (Nombre y firma)

Fecha

Esta parte debe ser completada por el investigador (o su representante)

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apegó a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Lic. Nut. Sara Alejandra Díaz Tena
Cédula Profesional: 5913994

ANEXO 3. CUESTIONARIO DE ANTECEDENTES MÉDICOS

Todas las respuestas son estrictamente confidenciales

1. Información general

Nombre: Inicie con 1. apellido paterno 2. materno 3.nombre	No. Registro:
Lugar de origen 1. País 2. Estado del país 3. Ciudad o comunidad	Edad:
Domicilio en Morelia: Calle y Colonia	Peso: _____ Kg
Talla: _____ m	IMC: _____ Kg/m ²

2. Antecedentes Patológicos Personales

Medicamentos (incluso suplementos naturales)	Alergias

Indique SI o NO, si padece o ha padecido alguna de las afecciones que se mencionan

Afección	SI/NO	Especificar	Afección	SI/NO	Especificar
Accidente cerebrovascular			Enfermedad gastrointestinal		
Artritis			Osteoporosis		
Asma			Enfermedad de la piel		
Cáncer			Hipertensión		
Cardiopatías			Hipertiroidismo		
Colesterol elevado			Hipotiroidismo		
Depresión			Infecciones renales		
Diabetes Mellitus			Enfermedad hepática		
Enfermedad Autoinmune			Enfermedades ópticas		
Enfermedad de transmisión sexual			Cirugías		
Enfermedad renal			Trastornos del sueño		
Enfermedad vías respiratorias			Otra(s)		

3. Antecedentes heredo-familiares (padres, hermanos, abuelos, tíos, primos etc.)

Relación familiar	Antecedente médico	Relación Familiar	Antecedente médico

ANEXO 4. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS



Instituto Nacional de Salud Pública
Centro de Salud en Investigación Poblacional
Cuestionario de Frecuencia de Consumo

Nombre del Paciente _____
Apellido Paterno Apellido Materno Nombre(s)

Nombre del Entrevistador _____

Nombre del Revisor _____

No. de identificación del Paciente _____

Fecha
Día Mes Año

Edad del Paciente (en años cumplidos) _____

Durante el año previo a este día ¿Con qué frecuencia consumió usted productos lácteos?
Por favor indique con una cruz, en la columna de frecuencia, la opción que considere más cercana a su realidad.
Encuestador: Por favor llene el círculo (no lo tache) y en la columna de la derecha el número correspondiente a la frecuencia de consumo reportada.

FRECUENCIA DE CONSUMO										
ALIMENTO		MENOS DE UNA VEZ AL MES		VECES A LA SEMANA			VECES AL DÍA			
PRODUCTOS LÁCTEOS		NUNCA (0)	1-3 (2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
1	UN VASO DE LECHE ENTERA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
2	UNA REBANADA DE QUESO FRESCO O ½ TAZA COTTAGE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
3	UNA REBANADA DE QUESO OAXACA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
4	UNA REBANADA DE QUESO MANCHEGO O CHIHUAHUA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
5	UNA CUCHARADA DE QUESO CREMA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
6	UNA TAZA DE YOGURTH O BULGAROS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
7	UN BARQUILLO CON HELADO DE LECHE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO FRUTAS			MENOS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DÍA			
		NUNCA (0)		1-3 (3)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
8	UN PLÁTANO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
9	UNA NARANJA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
10	UN VASO CON Jugo DE NARANJA O TORONJA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
11	UNA REBANADA DE MELÓN	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
12	UNA MANZANA FRESCA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
13	UNA REBANADA DE SANDÍA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
14	UNA REBANADA DE PIÑA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
15	UNA REBANADA DE PAPAYA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
16	UNA PERA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
17	UN MANGO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
18	UNA MANDARINA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
19	UNA PORCIÓN DE FRESAS (± 10)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
20	UN DURAZNO CHABACANO O NECTARINA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
21	UNA PORCIÓN DE UVAS (± 10-15)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
22	UNA TUNA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
23	UNA PORCIÓN DE CIRUELAS (± 6)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
24	UNA REBANADA DE MAMEY	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
25	UN ZAPOTE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO HUEVO, CARNES Y EMBUTIDOS			MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DÍA			
		NUNCA (0)		1-3 (2)	1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
26	HUEVO DE GALLINA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
27	UNA PIEZA DE POLLO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
28	UNA REBANADA DE JAMON	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
29	UN PLATO DE CARNE DE RES	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
30	UN PLATO DE CARNE DE CERDO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
31	UNA PORCION DE ATUN	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
32	UN PEDAZO DE CHICHARRON	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
33	UNA SALCHICHA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
34	UNA REBANADA DE TOCINO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
35	UN BISTECK DE HIGADO O HIGADITOS DE POLLO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
36	UN TROZO DE CHORIZO O LONGANIZA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
37	UN PLATO DE PESCADO FRESCO (mojarra, etc.)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
38	UN PLATO DE SARDINAS EN JITOMATE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
39	MEDIA TAZA DE MARISCOS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
40	UN PLATO DE CARNITAS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
41	UN PLATO DE BARBACOA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO VERDURAS	NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES (2)	VEC ES A LA SEMANA			VEC ES AL DÍA				
				1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)	
42 UN JITOMATE EN SALSA O GUISADO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
43 UN JITOMATE CRUDO O EN ENSALADA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
44 UNA PAPA O CAMOTE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
45 MEDIA TAZA DE ZANAHORIAS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
46 UNA HOJA DE LECHUGA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
47 MEDIA TAZA DE ESPINACAS U OTRA VERDURA DE HOJA VERDE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
48 MEDIA TAZA DE CALABACITAS O CHAYOTES	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
49 MEDIA TAZA DE NOPALITOS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
60 UN PLATO DE SOPA CREMA DE VERDURAS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
61 MEDIO AGUACATE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
62 MEDIA TAZA DE FLOR DE CALABAZA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
63 MEDIA TAZA DE COLIFLOR	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
64 MEDIA TAZA DE EJOTES	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
65 UNA CUCHARADITA DE SALSA PICANTE O CHILES CON SUS ALIMENTOS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
66 CHILES DE LATA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
67 UN PLATILLO CON CHILE SECO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
68 UN ELOTE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO LEGUMINOSAS		NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA			
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
59	UN PLATO DE FRIJOLES	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
60	MEDIA TAZA DE CHICHAROS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
61	UN PLATO DE HABAS VERDES	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
62	UN PLATO DE HABAS SECAS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
63	UN PLATO DE LENTEJAS O GARBANZOS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO CEREALES		NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA			
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
64	UNA TORTILLA DE MAIZ	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
65	TORTILLA DE TRIJO (TORTILLA DE HARINA)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
66	UNA REBANADA DE PAN DE CAJA (TIPO BIMBO)	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
67	UNA REBANADA DE PAN DE CAJA INTEGRAL	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
68	UN BOLILLO O TELERA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
69	UNA PIEZA DE PAN DULCE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
70	UN PLATO DE ARROZ	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
71	UN PLATO DE SOPA DE PASTA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
72	UN PLATO DE AVENA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
73	UN TAZON CEREAL DE CAJA (TIPO HOJUELAS DE MAIZ) ¿CUAL? _____	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
74	CEREAL ALTO EN FIBRA ¿CUAL? _____	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO		NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA			
GOLOSINAS					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
75	UNA REBANADA DE PASTEL	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
76	UNA CUCHARADITA DE ATE, MIEL, MERMELADA, CAJETA O LECHE CONDENSADA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
77	UNA CUCHARADITA DE CHOCOLATE EN POLVO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
78	UNA TABLILLA DE CHOCOLATE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
79	UNA BOLSA DE FRITURAS	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO		NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA			
BEBIDAS					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
80	UN REFRESCO DE COLA MEDIANO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
81	UN REFRESCO GASEOSO DE SABOR	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
82	UN REFRESCO DIETETICO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
83	UN VASO CON AGUA DE SABOR AZUCARADA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
84	UNA TAZA DE CAFÉ SIN AZUCAR	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
85	UNA TAZA DE ATOLE SIN LECHE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
86	UNA TAZA DE ATOLE CON LECHE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
87	UNA CERVEZA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
88	UNA COPA DE VINO DE MESA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	
89	UNA BEBIDA CON RON, BRANDY O TEQUILA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	

FRECUENCIA DE CONSUMO												
	ALIMENTO VERDURAS	NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DIA				
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)		6 (9)
90	ACEITE DE MAIZ	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
91	ACEITE DE SOYA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
92	ACEITE DE GIRASOL	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
93	ACEITE DE CARTAMO	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
94	ACEITE DE OLIVA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
95	UNA CUCHARADITA DE MARGARINA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
96	UNA CUCHARADITA DE MANTEQUILLA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
97	UNA CUCHARADITA DE CREMA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
98	UNA CUCHARADITA DE MAYONESA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
99	UNA CUCHARADITA DE MANTECA VEGETAL	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
100	UNA CUCHARADITA DE MANTECA ANIMAL	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

FRECUENCIA DE CONSUMO											
ALIMENTO ANTOJITOS		NUNCA (0)	MEN OS DE UNA VEZ AL MES (1)	VEC ES AL MES 1-3 (2)	VECES A LA SEMANA			VECES AL DÍA			
					1 (3)	2-4 (4)	5-6 (5)	1 (6)	2-3 (7)	4-5 (8)	6 (9)
101	UN TACO AL PASTOR	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
102	UN SOPE O QUESADILLA	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
103	UN PLATO CON POZOLE	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
104	UN TAMAL	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐

¿Cuántas cucharaditas de azúcar le agrega usted a sus alimentos, a lo largo del día? Tome en cuenta lo que le pone al café, licuado, etc.
_____ cucharaditas.

¿Le agrega usted sal a sus alimentos antes de probarlos?

Sí _____ No _____

¿Se come usted el pellejo del pollo?

Sí _____ No _____

¿Se come usted el gordito de la carne?

Sí _____ No _____

¿Cuántos meses del año pasado consumió usted vitaminas?

0	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12

¿Cuál o cuáles? _____

¿Cuántos meses del año pasado consumió usted suplemento de calcio?

0	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12

¿Cuál o cuáles? _____

¿Considera usted que su alimentación ha cambiado durante el último año?

Sí _____ No _____ (Si, sí ha cambiado, preguntar:)

¿Porqué? _____

Observaciones _____
