

De acuerdo con la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR  
Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de diciembre de 1996,  
México.

## Capítulo II De la Limitación a los Derechos Patrimoniales

### Artículo 148.-

*Las obras literarias y artísticas ya divulgadas podrán utilizarse, siempre que no se afecte la explotación normal de la obra, sin autorización del titular del derecho patrimonial y sin remuneración, citando invariablemente la fuente y sin alterar la obra, sólo en los siguientes casos:*

I. Cita de textos, siempre que la cantidad tomada no pueda considerarse como una reproducción simulada y sustancial del contenido de la obra;

II. Reproducción de artículos, fotografías, ilustraciones y comentarios referentes a acontecimientos de actualidad, publicados por la prensa o difundidos por la radio o la televisión, o cualquier otro medio de difusión, si esto no hubiere sido expresamente prohibido por el titular del derecho;

III. Reproducción de partes de la obra, para la crítica e investigación científica, literaria o artística;

IV. *Reproducción por una sola vez, y en un sólo ejemplar, de una obra literaria o artística, para uso personal y privado de quien la hace y sin fines de lucro. Las personas morales no podrán valerse de lo dispuesto en esta fracción salvo que se trate de una institución educativa, de investigación, o que no esté dedicada a actividades mercantiles;*

V. *Reproducción de una sola copia, por parte de un archivo o biblioteca, por razones de seguridad y preservación, y que se encuentre agotada, descatalogada y en peligro de desaparecer.*

Si usted es el autor de la obra y no desea que sea visualizada a través de este medio, favor de notificarlo por escrito a:

Universidad Autónoma de Nayarit. Dirección de Desarrollo Bibliotecario, Edificio de la Biblioteca Magna. Ciudad de la Cultura Amado Nervo s/n. Col. Los Fresnos. CP. 63190. Tepic, Nayarit.

O bien vía correo electrónico a: [ddb@uan.edu.mx](mailto:ddb@uan.edu.mx)

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

ESPECIALIDAD EN CIENCIAS AMBIENTALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

## **Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas en jornaleros indígenas huicholes del estado de Nayarit**

**P r e s e n t a**

M. en C. Yael Yvette Bernal Hernández

**Directora de tesis**

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

Tepic, Nayarit, junio de 2013



Tepic, Nayarit a 17 de Junio de 2013.

DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES  
CORDINADOR DEL POSGRADO CBAP

PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que la tesis de la estudiante de doctorado Yael Yvette Bernal Hernández titulada "Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas en jornaleros indigenas huicholes del estado de Nayarit", ha sido revisada y aprobada en contenido y formato. Por lo que consideramos que la estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Aurora Elizabeth Rojas Garcia

Dra. Irma Martha Medina Diaz

Dra. Maria de Lourdes Robledo Marengo

Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco

Dr. Manuel Iván Girón Pérez

Ccp. Archivo/AERG



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/163/2013.

Xalisco, Nayarit; 20 de junio de 2013.

ING. ALFREDO GONZÁLEZ JÁUREGUI  
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.

Con base al oficio de fecha 17 de junio del presente, enviado por la Directora de Tesis **Dra. Aurora Elizabeth Rojas García**, donde se indica que el trabajo de investigación cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha cumplido con los demás requisitos que solicita el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias; dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la **M.C. Yael Ivette Bernal Hernández**, continúe con los trámites necesarios para la presentación de grado de Doctorado en el Área de Ciencias Ambientales.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR LO NUESTRO A LO UNIVERSAL"

DR. DIEGO GARCÍA PAREDES  
COORDINADOR DEL POSGRADO



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la tutoría de la Dra. Aurora Elizabeth Rojas García y con financiamiento del proyecto NAY-2008-C01-93389 de FOMIX.

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Aurora Elizabeth Rojas Garcia, por conducirme esmeradamente hasta este momento. Por la confianza que me brindó, por su tiempo, disponibilidad y paciencia que siempre mostró hacia mi persona. Por los conocimientos transmitidos y el enorme aprendizaje que constantemente recibí de su parte, por su profesionalismo y calidez humana durante el desarrollo de mi investigación. Por todo el apoyo y motivación, que sin duda fueron fundamentales para la conclusión de este proyecto. Por contribuir en mi formación profesional y personal muchas gracias.

A la Dra. Lourdes Robledo Marengo porque definitivamente todo empezó con usted, su pasión por su trabajo me robó la atención en el aula de clases. Por sus conocimientos compartidos, por su invaluable labor formadora, su persistencia y atinada sabiduría. Sin duda es un gran ejemplo a seguir, doctora muchas gracias.

A la Dra. Irma Martha Medina Diaz, Dra. Briscia S. Barrón Vivanco y Dr. Manuel Iván Girón Pérez, por su tiempo y disposición en la revisión de este proyecto. Por sus conocimientos compartidos y sus acertados comentarios. Por sus valiosos consejos que definitivamente moldearon mi pensamiento y contribuyeron a mi formación profesional y personal. Por su disponibilidad y asesoría cuando la necesité. Por todo el apoyo que siempre recibí de su parte, muchas gracias.

A la Dra. Betzabeth Quintanilla Vega y Dra. Norma Elena Pérez Herrera, por sus acertados comentarios que sin duda enriquecieron el contenido de este trabajo, por sus conocimientos compartidos durante la realización de este proyecto y por su bonita amistad.

A la Dra. María Elena Moreno Godínez de la Universidad Autónoma de Guerrero por la donación de sondas para la determinación del polimorfismo de PON1 55.

Al Dr. Juan Diego García Paredes, por la comprensión y apoyo que siempre recibí de su parte, su labor fue elemental en la complementación de mi proyecto.

A la Dra. Delia Domínguez Ojeda por todo su apoyo, motivación y excelentes consejos, por transmitir la pasión por lo que hace, pero sobre todo por su invaluable amistad.

A Mayra y Sandra, irremplazables amigas y compañeras del laboratorio, por su calidez humana y de servicio, por el apoyo y todo el cariño que siempre recibí de su parte, muchas gracias.

A Patricia Medina, Yoli y Fabiola por todo el apoyo a lo largo del proyecto, pero sobre todo gracias por su bonita amistad.

Al Q.F.B. Manuel Salinas Mardueño y la M. en C. Martha Murillo Beltrán, por su comprensión y apoyo durante mis estudios de doctorado.

Al Ing. Rafael Rosas Parra Subdelegado de SEDESOL y al Ing. Joaquín Ramos Andrade coordinador del programa atención a jornaleros agrícolas de la misma secretaría. Por su interés en mi proyecto, por su valioso apoyo y las facilidades otorgadas durante las visitas a las comunidades indígenas. Agradezco también a los promotores del programa jornaleros agrícolas que amablemente me acompañaron a las comunidades indígenas.

A las comunidades indígenas de Pajuelazo y Santiago de Pochotitán, por la excelente respuesta a este proyecto. Por el aprendizaje recibido y por permitirme el acceso a su forma de vida.

A Elelia Díaz y Carmen Parra, gestoras indígenas de las comunidades de estudio. Mi más sincero agradecimiento por el interés en el desarrollo y la atención a sus

comunidades. Por el apoyo durante las visitas a campo y por compartirme valiosos conocimientos acerca de sus costumbres, muchas gracias.

A la secretaria de salud del estado por el apoyo en la determinación del grupo sanguíneo y biometría hemática de los participantes de este estudio.

A Laura Ortega y Carlos Humberto, por mantener el equilibrio en mi persona, por esos momentos de locura, por aguantarme y por hacer mucho más divertido el recorrido. Mucho éxito amigos!

A mis compañeros tesistas, prestadores de servicio social y prácticas profesionales del laboratorio de contaminación y toxicología ambiental, Carlos, Néstor, Luis, Fátima, Jeovany y Gil. Especialmente agradezco a Paco Herrera, Bryana, Alma Betzaida, Guillermina y Frank, por las inolvidables jornadas de trabajo, por tantos momentos compartidos, por todo su apoyo y disposición en la fase experimental y salidas a campo, su motivación y optimismo hicieron mucho más ameno el trabajo, sobre todo gracias por su bonita amistad. Ha sido un placer aprender y trabajar con ustedes. Éxito en todo lo que se propongan.

Agradezco a conacyt por el apoyo brindado durante el último semestre de este estudio.



## DEDICATORIAS

A la memoria de mi hermana Sofia Anahi Bernal Hernández†, mi padre Luis Antonio Bernal Vidaury† y mi abuelita Sofia Delgadillo Panu†, que siempre estuvieron presentes, en cada día a lo largo de este proyecto.

A mi madre Sofia Hernández Delgadillo, quien es un ejemplo para mí y a quien admiro por su enorme fortaleza y amor por los suyos. Por tu comprensión y apoyo incondicional. Mamá no tengo palabras para agradecer infinitamente todo lo que has hecho por la familia. Mi admiración y agradecimiento eterno.

A mis queridos hermanos, Luis Germán y Wilmar Antonio por su comprensión y apoyo incondicional, por los momentos alegres que compartimos y los días difíciles que aprendimos a superar, por el enorme cariño y la unión que existe entre nosotros.

A mi sobrino Iker Kaled, por ser la alegría de la casa, por enseñarme lo sencillo que es reír y disfrutar de cada momento.

A los jornaleros indígenas huicholes, que arriesgan sus vidas cada día en los campos agrícolas.

## RESUMEN

El uso de plaguicidas ha alcanzado proporciones masivas en el mundo, esto se ha traducido por un lado, en un beneficio para las áreas agropecuarias y del sector salud; y por otro, en repercusiones no siempre favorables para el ambiente. Diversas investigaciones han evaluado los efectos adversos de plaguicidas en trabajadores agrícolas mestizos en México, sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios en poblaciones de jornaleros indígenas. El objetivo de este trabajo fue evaluar una batería de biomarcadores toxicológicos de plaguicidas en jornaleros indígenas. Se realizó un estudio transversal, descriptivo y analítico en jornaleros indígenas huicholes. El grupo expuesto comprendió 64 jornaleros de la comunidad de Pochotitán y el grupo control de 62 individuos de la comunidad de Pajuelazo. La exposición crónica a plaguicidas, la presencia de síntomas relacionados con la exposición a los mismos y las características antropométricas de la población, se evaluaron mediante un cuestionario estructurado. La actividad de colinesterasas (BuChE y AChE) y el fenotipo de la enzima paraoxonasa-PON1 (ariesterasa, ARE y CMPasa) se evaluaron espectrofotométricamente, los parámetros hematológicos por citometría y los polimorfismos genéticos (PON1 M55L/Q192R y CYP2D6\*4) mediante PCR en tiempo real. Los resultados mostraron una disminución en la actividad BuChE y una tendencia a la disminución en la actividad de AChE en el grupo expuesto con respecto al grupo control. Por otro lado, se observó una alta prevalencia de anemia y baja concentración de eritrocitos en ambos grupos de estudio; los trabajadores expuestos a plaguicidas presentaron niveles más bajos de leucocitos pero niveles más altos de linfocitos que el grupo control. Con respecto a la actividad de PON1, se observó gran variabilidad interindividual en la población en general, los indígenas expuestos a plaguicidas presentaron una menor actividad ARE con respecto al grupo control. Se observó una asociación genotipo-fenotipo cuando se usó como sustrato 4-CMPA, así como una correlación entre la actividad de BuChE con ARE y la actividad de AChE con CMPasa. Los alelos de PON1 55L y 192R fueron los más frecuentes en ambos grupos de estudio, los cuales se asocian con alta capacidad de detoxificación de plaguicidas organofosforados (POF). El fenotipo

de PON1 estuvo modulado por la exposición a plaguicidas y por la presencia de polimorfismos genéticos en el gen de PON1. Asimismo, se observó que la frecuencia alélica del CYP2D6\*4 fue de 0.06. Sobre la base de los resultados obtenidos se demuestra que la exposición a plaguicidas modifica biomarcadores bioquímicos y hematológicos y que el fenotipo de PON1 puede ser utilizado como un biomarcador de susceptibilidad y exposición a POF. Se requiere de más estudios en los que se evalúen biomarcadores en diferentes escenarios de exposición a plaguicidas, lo anterior para poder tener un panorama más completo que contribuya en la evaluación del riesgo toxicológico de los plaguicidas en poblaciones indígenas.

## ABSTRACT

Pesticide use has reached massive proportions worldwide, this has resulted on the one hand, in a benefit to agricultural areas and health, on the other hand, this not always has favorable implications for the environment. There is research to evaluate the adverse effects of pesticides on mestizos farmworkers, however, no research has included indigenous farmworkers. The aim of this study was to evaluate a battery of toxicological biomarkers of pesticides in Huichol indigenous farmworkers. A cross-sectional, descriptive and analytical study was performed in Huichol farmworkers. The exposed group included 64 workers of Pochotitán community and the control group comprised 62 workers of Pajuelazo community. Chronic exposure to pesticides, the presence of symptoms related with exposure to these xenobiotics and anthropometric characteristics of the study population were evaluated using a structured questionnaire. The activity of cholinesterases (BuChE and AChE) and the paraoxonase phenotype- PON1 (arylesterase activity (ARE), and CMPasa) were evaluated spectrophotometrically, hematological parameters were evaluated using a cytometer and the genetic polymorphisms (PON1 M55L/Q192R and CYP2D6\*4) by real-time PCR. The results of this study showed a decrease in BuChE activity and a tendency in decreased of AChE activity in the group exposed, with respect to the reference population. On the other hand, a high prevalence of anemia and a decrease of red blood cell concentration was observed in both study groups. In addition, the workers exposed to pesticides had lower leukocyte levels but higher lymphocytes levels than the reference group. With regard to PON1 activity, a large variability in the general population was observed, the indigenous farmworkers exposed to pesticides had lower ARE activity compared to the reference group. In addition, a genotype-phenotype association was observed when 4-CMPA was used as substrate, and a correlation between BuChE and ARE activity and AChE and CMPasa activity were observed. The PON1 55L and 192R alleles were the more frequent in study population, they are related with high capacity of organophosphate pesticides (POF) detoxification. In this study, the PON1 phenotype was modulated by exposure to pesticides as well by the presence of genetic polymorphisms in the

PON1 gene. Also it was observed that the frequency of the CYP2D6\*4 allele in this study population was 0.06, this allele is associated with a poor or null xenobiotic biotransformation capacity by this cytochrome. The results of this study showed that pesticides modified biochemical and hematological biomarkers and also that PON1 phenotype can be used as a biomarker of exposure and susceptibility to POF. Finally, more biomarkers studies are required in different scenarios of exposure to pesticides in order to have a more complete scene that contributes to the toxicological risk assessment of pesticides in indigenous populations.

## ÍNDICE

Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
Lista de abreviaturas.....	xiii
Lista de figuras.....	xiv
Lista de tablas.....	xv
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Los plaguicidas en México.....	1
1.1.1 Plaguicidas en Nayarit.....	3
1.2 Jornaleros indígenas en Nayarit.....	4
1.3 Efectos de los plaguicidas sobre la salud humana.....	5
1.3.1 Efectos Agudos.....	5
1.3.2 Efectos crónicos.....	6
1.4 Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas.....	7
1.4.1 Biomarcadores de exposición.....	7
1.4.1.1 Inhibición de la BuChE como biomarcador de exposición a plaguicidas.....	8
1.4.2 Biomarcadores de efecto.....	9
1.4.2.1 Inhibición de la AChE como biomarcador de efecto a plaguicidas.....	9
1.4.2.2 Parámetros hematológicos y plaguicidas.....	10
1.4.3 Biomarcadores de susceptibilidad.....	11
1.4.3.1 Variabilidad genética y su relevancia en la biotransformación de plaguicidas.....	11
1.4.3.2 Polimorfismo genético de PON1 y su relevancia en la biotransformación de plaguicidas.....	12
1.4.3.3 Polimorfismo genético del CYP2D6*4 y biotransformación de plaguicidas.....	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>

<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>16</b>
4.1 Objetivos específico.....	16
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>17</b>
5.1 Población de estudio y muestreo.....	17
5.2 Recolección y procesamiento de muestras.....	18
5.3 Determinación de la actividad butirilcolinesterasa (BuChE).....	18
5.4 Determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE).....	19
5.5 Determinación de hemoglobina (Hb).....	20
5.6 Evaluación de parámetros hematológicos.....	21
5.7 Evaluación del fenotipo de PON1.....	22
5.7.1 Determinación de la actividad arilesterasa (ARE).....	22
5.7.2 Determinación de la actividad CMPasa.....	23
5.8 Evaluación del genotipo de PON1.....	23
5.8.1 Extracción y purificación del ADN.....	23
5.8.2 Integridad del ADN.....	25
5.8.3 Determinación de los polimorfismos genéticos de PON1 55, PON1 192 y CYP2D6*4, por PCR en tiempo real.....	26
5.9 Análisis estadístico.....	27
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
6.1 Características generales de la población de estudio.....	30
6.2 Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas.....	32
6.2.1 Colinesterasas.....	32
6.2.2 Parámetros hematológicos.....	33
6.2.3 Fenotipo de PON1.....	36
6.2.4 Genotipo de PON1.....	38
6.2.5 Desequilibrio genético de PON1.....	39
6.2.6 Relación fenotipo-genotipo de PON1 y su relación con las colinesterasas.....	39
6.2.7 Fenotipo y genotipo como predictores de AChE.....	40

6.2.8 Polimorfismo genético del CYP2D6*4.....	42
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>43</b>
7.1 Jornaleros indígenas huicholes.....	43
7.2 Colinesterasas como biomarcadores toxicológicos.....	44
7.3 Exposición a plaguicidas y daño hematológico.....	46
7.4 Fenotipo de PON1.....	47
7.5 Genotipo de PON1.....	48
7.6 Relación fenotipo-genotipo de PON1.....	49
7.7 Polimorfismo genético del CYP2D6*4 en una población indígena huichol.....	51
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>53</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>54</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>55</b>



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARE	Ariesterasa
BuChE	Butirilcolinesterasa
CB	Carbamatos
CDC	Centro para el control y prevención de enfermedades
CHE	Colinesterasas
CHCM	Concentración de hemoglobina corpuscular media
CMPasa	Actividad de PON1 con el sustrato 4-CMPA
CYP	Citocromo
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAM	6-carboxifluoresceína
FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
Hb	Hemoglobina
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
INAFED	Instituto nacional para el federalismo y el desarrollo municipal
INEGI	Instituto nacional de estadística y geografía
IMC	Índice de masa corporal
MPV	Volumen medio de plaquetas
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organización mundial de la salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
POF	Plaguicidas organofosforados
PON1	Paraoxonasa 1
SAGARPA	Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentos
SSN	Servicios de salud de Nayarit
TBE	Tris-borato-EDTA
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Casos de intoxicación por plaguicidas en México.....	2
<b>Figura 2.</b> Número de casos por intoxicación con plaguicidas en Nayarit.....	4
<b>Figura 3.</b> Actividad BuChE en la población, de acuerdo con el grupo de estudio (a) y género (b).....	34
<b>Figura 4.</b> Actividad AChE en la población, de acuerdo con el grupo de estudio (a) y género (b).....	34
<b>Figura 5.</b> Fenotipo de PON1, actividad ARE (a), actividad CMPasa (b).....	36
<b>Figura 6.</b> Actividad de PON1 (CMPasa/ARE). Actividad PON1 con fenilacetato y 4-CMPA (a), número acumulativo de individuos <i>versus</i> la tasa de actividad de PON1 (CMPasa/ARE) (b).....	37
<b>Figura 7.</b> Frecuencias de diplotipos de PON1 en la población de estudio (n=126)..	40

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencia de oligonucleótidos y sondas TaqMan.....	29
<b>Tabla 2.</b> Características antropométricas de la población de estudio.....	31
<b>Tabla 3.</b> Plaguicidas más utilizados por la población de estudio.....	32
<b>Tabla 4.</b> Parámetros hematológicos en la población de estudio.....	35
<b>Tabla 5.</b> Correlación entre colinesterasas y actividad de PON1.....	38
<b>Tabla 6.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas de PON1.....	39
<b>Tabla 7.</b> Relación fenotipo, genotipo de PON1 y colinesterasas en la población de estudio.....	41
<b>Tabla 8.</b> Fenotipo y genotipo de PON1 como predictores de la actividad AChE.....	42
<b>Tabla 9.</b> Frecuencias genotípicas y alélicas del CYP2D6*4 en la población de estudio.....	42
<b>Tabla 10.</b> Frecuencia alélica de PON1 en poblaciones humanas.....	50
<b>Tabla 11.</b> Frecuencia del polimorfismo genético CYP2D6*4 en poblaciones humanas.....	52

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Los plaguicidas en México

Los plaguicidas son los productos químicos más utilizados por el hombre para el control de plagas (Mansour, 2004). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define a los plaguicidas como: cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluidos vectores de enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas para plantas o animales que causen perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sus derivados que pueden administrarse para combatir insectos, arácnidos u otras plagas (FAO, 2003).

De acuerdo a las agencias de regulación, alrededor del 30% de los plaguicidas con destino a la agricultura y a la salud pública que se comercian en países en desarrollo, no cumplen las normas de calidad aceptadas internacionalmente. Estos plaguicidas contienen con frecuencia compuestos o impurezas que han sido restringidos en otros países por sus efectos adversos para la salud humana y el ambiente (OMS, 1990).

En México se utiliza el 60% de los 22 plaguicidas clasificados como perjudiciales para la salud y el ambiente de los cuales, el 42% de se fabrican en el país. Así también, se emplean 30 de 90 plaguicidas que han sido cancelados o restringidos en EE.UU (INEGI, 1998). Éstos se utilizan con fines agrícolas, en campañas de salud, desinfección de casas, industrias y jardines; sin embargo, en la agricultura se emplea la mayor parte de los plaguicidas (González-Farías, 2003). Los cultivos a los que se aplica el mayor volumen de éstos son: maíz, algodón, papa, chile, jitomate, frijol, trigo, aguacate, café y tabaco, en cantidades que van desde 395 hasta 13,163 toneladas al año (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arrollo, 2007).

Por otro lado, la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México, reportó que la cantidad de casos de intoxicación por plaguicidas decreció de forma significativa de 8,000 a 2,532, entre 1995 y 2001. No obstante, el registro también menciona que al siguiente año la cifra aumentó ligeramente a 2,802, en 2003 se elevó nuevamente a 3,849 y en 2005 fue de 3,898 casos. Sin embargo, las propias autoridades reconocen que existe un subregistro o "cifra negra" en el número de casos de intoxicación por el uso de agroquímicos (Perea, 2006) (Figura 1).

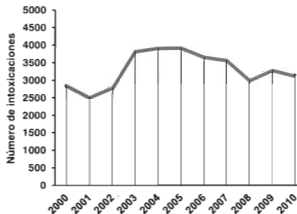


Figura 1. Casos de intoxicación por plaguicidas en México  
(Fuente: DGE, 2013).

Hasta el momento, no se han encontrado datos precisos sobre la cantidad de plaguicidas que se utilizan actualmente en el país. Albert (2005) señaló que el consumo aproximado de ingredientes activos en el año 2000 fue de 50,000 toneladas anuales. El uso de plaguicidas es intenso en algunas regiones y cultivos. Los estados con mayor uso de plaguicidas son Sinaloa, Chiapas, Veracruz, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco, Estado de México, Puebla y Oaxaca. En estos se aplica el 80% del total de plaguicidas usados

en el país (Albert, 2005). En términos generales los plaguicidas de mayor uso son los herbicidas, seguidos de insecticidas y fungicidas (Albert, 2005; González-Arias et al., 2010). Asimismo, la información disponible en cuanto al volumen y tipos de plaguicidas aplicados anualmente en los campos agrícolas y el grado de contaminación con productos tóxicos es prácticamente inexistente. Además de la gran cantidad de productos que se aplican, existe el problema de la recolección, tratamiento y disposición final de más de 12,000 envases vacíos de plaguicidas (Martínez-Valenzuela y Gómez-Arrollo, 2007).

### 1.1.1 Plaguicidas en Nayarit

En el estado de Nayarit la principal actividad económica del sector primario es la agricultura, por lo que el uso de plaguicidas favorece la obtención de más y mejores cosechas. En la región Costa-Centro de Nayarit existen 43,264 unidades de producción con superficie agrícola, vivero o invernadero, que representan el 69.09% del total estatal y donde el uso de plaguicidas es inevitable (INEGI, 2012).

En un estudio realizado por González-Arias et al. (2010), se menciona que los plaguicidas frecuentemente vendidos y en consecuencia usados son los insecticidas (45.9%), herbicidas (30.5%) y fungicidas (20.1%). De acuerdo a su grupo químico los más utilizados fueron los plaguicidas organofosforados (POF), seguidos de los piretroides y carbamatos (CB). Dentro de los insecticidas los más utilizados son clorpirifos, metamidofos, paratión metílico y dimetoato. De éstos, tres pertenecen al grupo IA (extremadamente peligrosos) y siete corresponden al grupo IB (altamente peligrosos) mismos que son responsables de la mayoría de intoxicaciones agudas y muertes (OMS, 2004). Asimismo, este estudio reveló que la zona con mayor uso de plaguicidas en Nayarit es la zona norte (Acaponeta, Rosamorada, Ruiz, San Blas, Santiago Ixcuintla, Tecuala y Tuxpan) y es la que mayor número de casos de intoxicaciones registra anualmente.

Nayarit es uno de los nueve estados del país en el que anualmente se registran más de 100 intoxicaciones agudas por plaguicidas en números absolutos (Figura 2). Durante 2007 se reportaron 203 casos de intoxicaciones, 62% más que en 2006 (SSN, 2007; 2008). Sin embargo, el número de casos puede estar subestimado, pues no siempre se asocian los síntomas con la exposición a estos compuestos (González-Arias et al., 2010).

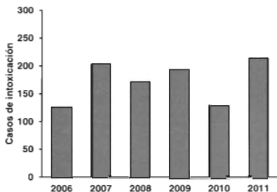


Figura 2. Número de casos por intoxicación con plaguicidas en Nayarit (Fuente: DGE, 2013).

## 1.2 Jornaleros indígenas en Nayarit

Debido a la producción agrícola en gran escala en el campo nayarita, se han empleado dos principales grupos de jornaleros agrícolas: los locales (mestizos que residen en las comunidades aledañas a los campos agrícolas) y los indígenas migrantes (Mackinlay, 2008).

Los jornaleros indígenas, son campesinos que trabajan sus tierras para el autoconsumo en sus comunidades de origen. Entre los meses de enero y mayo

(época de secas), cuando sus tierras son improductivas, migran a la planicie costera del estado, para emplearse en diversas labores agrícolas.

Hasta el momento, no hay registros precisos del número de jornaleros indígenas y la proporción que guardan con respecto a los jornaleros locales. En este sentido, Heredia et al. (2003) reportaron que la gran mayoría de los jornaleros indígenas en el estado de Nayarit son huicholes (69%) y en menor proporción coras (19%), tepehuanos (10%) y mexicaneros (2%).

Anualmente, cerca del 40% de las familias huicholas dejan sus comunidades en temporada de secas para buscar empleo en los campos agrícolas de la costa, donde se cultivan productos como tabaco, frijol, sandía, jicama, y chile verde (INEGI, 2005; INAFED, 2010). De acuerdo a las recomendaciones emitidas por SAGARPA, para el control de plagas en estos productos se utilizan principalmente POF y en menor proporción CB (SAGARPA, 2008). La Asociación Rural de Interés Colectivo y las representaciones locales de las uniones de cañeros y frijoleros reportan que, de los 80 mil indígenas, unos 20 mil llegan a los cultivos de tabaco, 25 mil a la caña y otros tantos a los de frijol, el resto labora en cultivos de chile. Hasta el momento, no hay estudios relacionados con el impacto que tienen los plaguicidas sobre la salud de jornaleros indígenas en Nayarit. Sin embargo, se sabe de la incidencia de intoxicaciones por plaguicidas en estos grupos sociales, específicamente en las zonas agrícolas donde el uso de estas sustancias es alto.

### **1.3 Efectos de los plaguicidas sobre la salud humana**

#### **1.3.1 Efectos agudos**

Los plaguicidas constituyen un grupo muy amplio de sustancias con una gran variedad de efectos tóxicos potenciales, que se manifiestan a través de diversos signos y síntomas, dependiendo del nivel y duración de la exposición. La toxicidad aguda de los plaguicidas de uso habitual se ha caracterizado bien desde hace



décadas (Maroni et al., 2000). Los efectos agudos sistémicos son los más importantes, sin embargo, muchos de estos compuestos pueden producir reacciones locales tras una exposición tópicamente sobre los ojos, piel o tracto respiratorio. Además, cabe mencionar que muchos individuos expuestos pueden presentar reacciones tóxicas locales con ausencia de sintomatología sistémica (O'Malley, 1997). Entre los síntomas de intoxicación aguda por POF o CB se incluyen dolor de cabeza, mareos, hipersecreción (transpiración, salivación, lagrimeo y rinorrea), espasmos musculares, debilidad, temblor, falta de coordinación, vómito, calambres abdominales y diarrea (Hashmi y Khan, 2011).

Por otro lado, la ausencia de efectos agudos puede ser debida a que la exposición habitual a plaguicidas no es lo suficientemente intensa para producir efectos. En este sentido, los estudios epidemiológicos sobre sus efectos agudos deben interpretarse con cuidado, dada la existencia de sesgos de información por parte de los participantes y la relativamente baja concentración de plaguicidas a la que están expuestos. También, se debe tener en cuenta que ocupacionalmente no se está expuesto sólo a una clase de plaguicidas sino que, con frecuencia a varios y en especial a mezclas.

### 1.3.2 Efectos crónicos

Los efectos crónicos han sido menos estudiados, hay antecedentes de que estos xenobióticos presentan actividad estrogénica (*o,p'*-DDT, endosulfán, clordano y dieldrin) (Carreño et al., 2006) y androgénica (DDE) (Kelce et al., 1998). Así como una asociación entre la exposición y la presencia de criptorquidia (Damgaard et al., 2006), alteraciones hormonales (Recio et al., 2005) y malformaciones congénitas (Restrepo et al., 1990). Otros estudios han demostrado la capacidad mutagénica de los plaguicidas y la asociación con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Alavanja et al., 2004). También, se ha descrito que tienen efectos inmunológicos y a nivel de sistema nervioso central; como los POF y CB que son capaces de inhibir la

actividad de colinesterasas, tanto en suero (butirilcolinesterasa, BuChE ó pseudocolinesterasa) como en eritrocitos (acetilcolinesterasa, AChE, ó colinesterasa verdadera) con el consiguiente efecto en el sistema nervioso central (Jeyaratnam y Maroni, 1994). Al respecto, existen estudios sobre los efectos crónicos de los POF que han puesto de manifiesto algunos efectos a largo plazo, especialmente en la ejecución de funciones en las que están implicados tanto el sistema nervioso central como el periférico.

#### **1.4 Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas**

La Academia Nacional de Ciencias de EE.UU. define a un biomarcador como "una variación en la respuesta biológica, fisiológica o bioquímica inducida por un xenobiótico que puede ser medida en un sistema biológico" (Huggett et al., 1992). La OMS los define como cualquier medición que refleja una interacción entre un sistema biológico y un agente medioambiental, que puede ser química, física o biológica (OMS, 1993). Los biomarcadores se clasifican en tres categorías: de exposición, efecto y susceptibilidad genética (Rojas-García et al., 2011; Araoud et al., 2011).

En los últimos años se ha prestado creciente atención al estudio de biomarcadores toxicológicos de plaguicidas en poblaciones humanas. Éstos se utilizan para detectar los efectos adversos de los plaguicidas antes de la manifestación clínica y el desarrollo de la enfermedad, así como para detectar la presencia de una exposición, identificar a individuos susceptibles de una población y para fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (Peña et al., 2001; Araoud, 2011).

##### **1.4.1 Biomarcadores de exposición**

Los biomarcadores de exposición constituyen una sustancia exógena, su metabolito o el producto de una interacción entre un xenobiótico y una molécula o célula, que se mide en un compartimento dentro de un organismo (OMS, 1993). Estos

biomarcadores pueden predecir un cambio en el riesgo de la enfermedad, pero no un efecto tóxico. Asimismo, proporcionan información acerca de la dosis interna, dosis externa y la dosis biológicamente efectiva mediante el análisis químico del compuesto tóxico o sus metabolitos en fluidos corporales (Benford et al., 2000; Ramirez y Lacasaña, 2001).

Originalmente estos biomarcadores se desarrollaron para medir la exposición laboral que tiende a ser más intensa, logrando buenos resultados. Fuera de este ámbito carecían de la sensibilidad suficiente para detectar exposiciones de bajo nivel como la que prevalece en la población general. Sin embargo, en los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU (CDC) se han desarrollado métodos aplicables tanto para exposiciones agudas como crónicas, ocupacionales o ambientales, que incluso permiten establecer valores de referencia para las concentraciones de varios metabolitos de plaguicidas en orina y sangre (Hill et al., 1995).

Para el caso en particular de exposición a POF, frecuentemente se utiliza la medición de alquilfosfatos en orina, así como la medición de para-nitrofenol en orina para el caso del paratión y metil-paratión (Barr et al., 2002; Bouwman et al., 2006; Harley et al., 2011). Sin embargo una de las herramientas más importantes y utilizadas para evaluar exposición a POF y CB es la actividad de las colinesterasas (Maroni et al., 2000; Hernández et al., 2005, Souza et al, 2005; Safi et al., 2005; Stefanidou et al., 2009; Ng et al., 2009; Simoniello et al., 2010; Ueyama et al., 2010).

#### 1.4.1.1 Inhibición de la BuChE como biomarcador de exposición a plaguicidas

La BuChE (EC 3.1.1.8), también conocida como pseudo-colinesterasa, se encuentra en el plasma y su función fisiológica aún no está bien definida (Eddleston et al., 2008). La depresión de la actividad BuChE no está necesariamente asociada con los fármacos anti-colinérgicos, ya que se ha observado una fuerte disminución en la

actividad BuChE en ausencia de cualquier efecto sobre la AChE de eritrocitos (Soltaninejad et al., 2007).

Por otro lado, se ha propuesto que la BuChE podría ser un indicador de exposición más sensible que la AChE a ciertos compuestos POF como malatión, diazinón, y diclorvos (He, 1999; Ranjibar et al., 2002; Hernández et al., 2006; Jintana et al., 2009; Rastogi et al., 2008; Araoud et al., 2011). Así también, se ha descrito que la inhibición de la BuChE se relaciona con la intensidad, duración de la exposición y el tipo de plaguicida (Araoud et al., 2011). Sin embargo, la inhibición de la misma no refleja los efectos biológicos de los POF en el sistema nervioso (He, 1999). En este sentido Kamel y Hoppin, (2004) mencionaron que la AChE es mejor biomarcador de exposición crónica a POF que la BuChE. Aunque se ha propuesto que la evaluación de BuChE puede ser utilizada para estimar los efectos agudos de la exposición a POF debido que la AChE es menos sensible (Wilson, 2001).

#### 1.4.2 Biomarcadores de efecto

Estos biomarcadores, determinan los cambios fisiológicos, bioquímicos, genéticos, moleculares o de comportamiento que ocurren en un organismo, y que dependiendo de la magnitud, se pueden asociar con un deterioro de la salud o posible enfermedad (OMS, 1993). Muchos biomarcadores de efecto se utilizan en la práctica cotidiana para ayudar en el diagnóstico clínico con fines preventivos. Un biomarcador de efecto ideal, es aquel que mide el cambio que todavía puede ser reversible (Araoud et al., 2011).

##### 1.4.2.1 Inhibición de la AChE como biomarcador de efecto a plaguicidas

La AChE (EC 3.1.1.7) es la enzima responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en colina y ácido acético en la sinapsis nerviosa. La inhibición de la AChE está vinculada directamente con el mecanismo de acción tóxica de los POF y CB que

bloquean la acción de esta enzima (Reigart y Roberts, 1999). Los diversos tipos de POF pueden inhibir la AChE en un grado diferente (Costa et al., 2005). Cuando los POF están presentes, la AChE se fosforila y no es capaz de romper la acetilcolina en colina y ácido acético, lo que resulta en la acumulación de la acetilcolina endógena responsable de los signos y síntomas típicos (muscarínicos y nicotínicos) que ocurren después de la intoxicación aguda (Maroni et al., 2000). Al quedar la neurona en un estado continuo de excitación se produce temblor, vómito, pérdida de equilibrio y eventualmente coma y muerte (Reigart y Roberts, 1999).

La actividad AChE ha sido ampliamente utilizada como biomarcador de efecto y exposición a POF y CB (Holmstedt, 1959; Hernández et al., 2005; Souza et al., 2005; Safi et al., 2005; Stefanidou et al., 2009; Ng et al., 2009; Simonello et al., 2010; Ueyama et al., 2010). Incluso, se han observado asociaciones entre la exposición a estos compuestos, síntomas de toxicidad crónica y disminución en la actividad AChE en poblaciones expuestas (Hernández et al., 2004; Rendón-von Osten et al., 2004; Hernández et al., 2005; Gamlin et al., 2007; Remor et al., 2009).

#### 1.4.2.2 Parámetros hematológicos y plaguicidas

Hasta el momento, existe poca información en la literatura en la que se explique el efecto de los plaguicidas sobre diferentes parámetros hematológicos. Al respecto, Parrón et al. (1996) mencionaron que fumigadores de invernaderos, crónicamente expuestos a plaguicidas, presentaron una disminución en la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) y en el volumen medio de plaquetas (MPV), 38% y 15% respectivamente. Además de alteraciones en el diferencial de glóbulos blancos, como un aumento del 5% de monocitos y 4% de eosinófilos.

### 1.4.3 Biomarcadores de susceptibilidad

Estos biomarcadores constituyen un indicador de la capacidad inherente o adquirida de un organismo para responder ante una exposición a xenobióticos. Estos marcadores biológicos manifiestan el riesgo individual a desarrollar efectos adversos después de una exposición, además ofrecen una oportunidad para la identificación, reconocimiento y protección de personas sensibles (OMS, 1993). Son de especial interés, ya que están determinados genéticamente y puede predisponer a un mayor riesgo en el caso de la exposición a plaguicidas (Hernández et al., 2003).

#### 1.4.3.1 Variabilidad genética y su relevancia en la biotransformación de plaguicidas

El conocimiento de las interacciones entre los agentes presentes en el ambiente y el hombre ha adquirido gran relevancia, actualmente se sabe que existe una considerable diferencia de una persona a otra respecto a los niveles de las enzimas encargadas de biotransformar xenobióticos y sus actividades (Lucas et al., 2001). En estas diferencias la presencia de polimorfismos genéticos juega un papel fundamental, ya que las variantes alélicas pueden alterar la capacidad individual para metabolizar los tóxicos. De esta manera, la presencia de un polimorfismo genético tiene relevancia a nivel funcional, lo que incluye cambios en el nivel de expresión del RNA mensajero (mRNA) ó la proteína, la selectividad por el sustrato o su actividad enzimática (Zanger et al., 2008). El efecto final depende básicamente de la localización del cambio dentro de la secuencia del gen. Un cambio a nivel de promotor, por ejemplo, podría modificar la unión de algún factor de transcripción y por lo tanto modificar la expresión del mRNA y por ende los niveles de proteína. Por otro lado, un cambio en un exón podría modificar un codón y con ello generar un cambio de aminoácido al momento de la traducción. Los cambios intrónicos, por su parte, pueden generar alteraciones en el splicing del pre-mRNA y por ende la estructura primaria de la proteína (Zanger et al., 2008).

#### 1.4.3.2 Polimorfismo genético de PON1 y su relevancia en la biotransformación de plaguicidas

La Paraoxonasa (PON1, EC 3.1.8.1) es una A-esterasa dependiente de calcio que se sintetiza principalmente en hígado y se asocia con lipoproteínas de alta densidad (HDL) en el plasma. Hasta el momento se desconoce su papel fisiológico; sin embargo, es capaz de hidrolizar múltiples sustratos, entre éstos tri-ésteres del ácido fosfórico (paraoxón y diazinón) y sus metabolitos (paratión y diazinón), ésteres aromáticos (fenilacetato y naftilacetato), ésteres de estrógeno y agentes nerviosos (sarín y somán), así como también lípidos oxidados y un número de fármacos o profármacos (La Du, 1992; Costa et al., 2003; Teiber et al., 2007; Kanamori-Kataoka y Seto, 2009). La actividad de PON1 se ha observado en diferentes tejidos, tales como hígado, riñón, intestino y sangre. En mamíferos, las actividades más altas de esta enzima se han observado en sangre e hígado. Otras especies como aves, peces e insectos, tienen poca o nula actividad de esta enzima (Draganov y La Du, 2004). Estudios en animales, proporcionan evidencia de que PON1 juega un papel importante en la desintoxicación de POF *in vivo* y en la modulación de su toxicidad (Costa et al., 2003).

Asimismo, diversos estudios han identificado la influencia de factores genéticos y ambientales sobre la actividad de PON1 y la susceptibilidad a contaminantes ambientales (Aviram y Rosenblat, 2005; Costa et al, 2005; Rainwater et al., 2009).

Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 200 polimorfismos en el gen de la PON1, que conducen a variantes de la enzima con mayor o menor actividad y con diferentes niveles de expresión (Costa et al., 2003; Quintanilla-Vega et al., 2012). Cuatro polimorfismos en la región promotora en las posiciones -108 (T/C), -126 (G/C), -162 (A/G) y -909 (C/G) se han relacionado con diferencias en la actividad y expresión de PON1 (Leviev y James, 2000; Suehiro et al., 2000; Brophy et al., 2001).

En los últimos diez años, dos polimorfismos en la región codificante de PON1 se han estudiado ampliamente, el polimorfismo de PON1 55 (L/M) y PON1 192 (Q/R).

En la posición 55, hay una sustitución de metionina (M) por leucina (L), este polimorfismo se relaciona con diferencias en la actividad y variabilidad en los niveles de PON1 en el plasma y parece que no afecta la afinidad catalítica de la enzima (Blatter-Garin et al., 1997; Mackness et al., 1998; Brophy et al., 2001; Aviram y Rosenblat, 2005). Sin embargo, se ha observado que la isoenzima 55M tiene menor actividad que la isoenzima 55L (Richter y Furlong, 1999; Cataño et al., 2006; Sepahvand et al., 2007) debido en parte al desequilibrio de ligamiento con el alelo -108C (Brophy et al., 2001) y a un aumento en la estabilidad de la isoenzima 55L (Leviey y James, 2000). En cuanto al polimorfismo en la posición 192, una glutamina (Q) es sustituida por arginina (R), esta sustitución confiere mayor eficiencia catalítica a la enzima, por lo que difieren considerablemente en su afinidad y actividad catalítica hacia diversos sustratos (Draganov y La Du, 2004). Sin embargo, estudios iniciales mostraron que el alelo 192R hidroliza paraoxón a una mayor velocidad que el alelo 192Q (Adkins et al., 1993; Humbert et al., 1993; Li et al., 2000). La existencia de polimorfismos de PON1 que confieren diferente capacidad de hidrólisis hacia POF, así como diferentes niveles de expresión de esta enzima, sugiere que ciertos individuos pueden ser más susceptibles a los efectos tóxicos de los POF.

#### 1.4.3.3 Polimorfismo genético del CYP2D6\*4 y biotransformación de plaguicidas

El citocromo P450 (CYP, EC 1.14.14.1) es una superfamilia de hemoproteínas que oxidan un gran número de sustancias endógenas (eicosanoides y esteroides) y xenobióticos (fármacos terapéuticos y contaminantes ambientales) a compuestos más hidrofílicos (Nebert y Russell, 2002). Las reacciones catalizadas por el CYP son reacciones de monooxigenación dependientes de NADPH, las cuales utilizan oxígeno molecular (Santiago et al., 2002). Como consecuencia de estas reacciones, se acelera la eliminación de numerosos xenobióticos del organismo, así como la activación de toxinas o precursores (Donato, 2004).



El CYP2D6 es la isoforma que presenta mayor variabilidad interindividual, dado que los factores ambientales influyen muy poco en su expresión y actividad (Zanger et al., 2008). El gen que codifica para CYP2D6 está localizado en el cromosoma 22q13.1 cerca de dos pseudogenes alineados en tándem (Grimán et al., 2009). El CYP2D6 se expresa en hígado, intestino y neuronas cerebrales. Representa aproximadamente de 2-4% de los CYP's hepáticos y metaboliza cerca de 25% de los medicamentos utilizados actualmente, entre ellos,  $\beta$ -bloqueadores, antidepresivos tricíclicos, neurolépticos, opiáceos y antiarrítmicos (Schaeffeler et al., 2003; Zanger et al., 2008), también cataliza la biotransformación oxidativa de POF como paratión, clorpirifos y diazinón (Sams et al., 2000; Alanis-Bañuelos et al., 2007).

El gen del CYP2D6 es altamente polimórfico, y aunque no todos los polimorfismos presentes son relevantes a nivel fenotípico, algunos son determinantes en la biotransformación de xenobióticos (Espíritu, 2008). Lo anterior conlleva a una alteración en la actividad de la enzima, lo que causa ausencia, disminución o aumento en la actividad. Actualmente, se han descrito más de 63 diferentes variantes del gen CYP2D6. Entre ellos, los más importantes son CYP2D6\*4 (splicing defectuoso) y CYP2D6\*5 (supresión de gen) (Sosa-Macías y Lares-Asseff, 2010).

El polimorfismo genético de esta enzima da origen a distintos grupos de individuos en la población: metabolizadores pobres (MP), intermedios (MI), rápidos o extensivos (ME) y ultrarrápidos (MU) que difieren en la capacidad metabólica de esta enzima (Kurose et al., 2012).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

El uso de plaguicidas ha alcanzado proporciones masivas en todo el mundo, esto se ha traducido, por un lado, en un beneficio para las áreas agropecuarias y el sector salud y por otro, en repercusiones no siempre favorables para el ambiente y el ser humano. Al respecto, existen algunos trabajos realizados en trabajadores agrícolas mestizos de algunas regiones del norte y sureste del país, en los que se han evaluado diferentes efectos adversos de la exposición ocupacional a estos compuestos. Sin embargo, hasta el momento no se han realizado investigaciones encaminadas a evaluar baterías de biomarcadores toxicológicos en trabajadores agrícolas, donde se incluya a la población indígena. Por lo que en el presente proyecto se analizaron diferentes biomarcadores de efecto, exposición y susceptibilidad genética en trabajadores agrícolas indígenas expuestos a plaguicidas en el estado de Nayarit, lo que sentará las bases para futuras investigaciones en este tipo de poblaciones

## **3. HIPÓTESIS**

Los jornaleros indígenas huicholes, presentarán alteraciones en diversos biomarcadores como consecuencia de la exposición a plaguicidas y éstas están influenciadas por la carga genética de la población.

#### **4. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar biomarcadores de efecto, exposición y susceptibilidad a plaguicidas en jornaleros indígenas huicholes del estado de Nayarit.

##### **4.1 Objetivos específicos**

1. Identificar las poblaciones indígenas mediante marcadores genéticos (ABO, Rh) y sociales.
2. Evaluar el uso de equipo de protección y la presencia de sintomatología asociada con la exposición crónica a plaguicidas.
3. Determinar la actividad enzimática de la butirilcolinesterasa y acetilcolinesterasa.
4. Evaluar daño hematológico por exposición a plaguicidas.
5. Determinar el fenotipo (ARE y CMPA) y genotipo de PON1 (55 y 192).
6. Determinar la presencia del polimorfismo del CYP 2D6\*4.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Población de estudio y muestreo

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y analítico en jornaleros indígenas huicholes de dos comunidades del estado de Nayarit. Se les explicaron los objetivos generales del estudio y se les invitó a participar en el mismo. Los individuos que aceptaron participar firmaron una carta de consentimiento informado. A través de un cuestionario se evaluaron las características socioeconómicas, antropométricas, edad, dieta, hábitos nocivos (consumo de drogas, tabaco y alcohol), así como la exposición a plaguicidas, síntomas relacionados con la exposición a plaguicidas y el uso de equipo de protección adecuado.

Se consideraron como criterios de inclusión: que fueran jornaleros indígenas huicholes, mayores de 18 años y que aceptarán participar voluntariamente en el estudio. Todos los participantes seleccionados debían portar el grupo sanguíneo O (grupo ABO) y Rh +, compartir las tradiciones culturales propias de la etnia, y hablar el dialecto indígena huichol. El estudio fue aprobado por la Comisión de Bioética de Nayarit.

El muestreo se realizó de septiembre a noviembre de 2011. El grupo expuesto comprendió 64 jornaleros de la comunidad de Pochotitán. En esta comunidad, los jornaleros se dedican a las labores agrícolas prácticamente todo el año. Durante los meses de enero a mayo trabajan en los campos agrícolas de las costas, principalmente en el cultivo de chile, tabaco, sandía, frijol, entre otros. Una vez finalizado este periodo regresan a sus comunidades en donde trabajan en la preparación de tierras para cultivo en zonas cercanas a su comunidad donde se utilizan mayormente herbicidas como el glifosato.

El grupo control comprendió 62 individuos de la comunidad de Pajuelazo, que no estuvieron expuestos a plaguicidas al momento de la toma de muestra y que compartían características antropométricas similares al grupo expuesto. Los individuos de esta comunidad una vez que regresan de la costa se dedican a la pesca y se emplean como trabajadores de la construcción.

## 5.2 Recolección y procesamiento de muestras

Para llevar a cabo las determinaciones, a los participantes se les pidió una muestra de sangre venosa, la cual fue extraída por venopunción. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante para la extracción de ADN y el análisis de los polimorfismos genéticos (PON1 55 y 192 y CYP 2D6\*4), así como para determinar la actividad AChE y evaluar los parámetros hematológicos. Se utilizaron tubos con heparina como anticoagulante para evaluar la actividad de PON1 utilizando fenilacetato y 4-clorometilfeilacetato (4-CMPA) como sustrato. La actividad BuChE fue determinada en suero.

## 5.3 Determinación de la actividad butirilcolinesterasa (BuChE)

### Reactivos

- Kit colinesterasa butirilcolina (Biosystems®) el cual contiene: reactivo A (pirofosfato 95 mmol/L, hexacianoferrato (III) 2,5 mmol/L, pH 7,6) y reactivo B (butiriltiocolina 60 mmol/L).

### Fundamento

La BuChE hidroliza la butiriltiocolina para formar tiocolina y butirato. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de desaparición del hexacianoferrato (III), medida a 405 nm por medio de las siguientes reacciones:

- $$\text{BuChE}$$
1. Butiriltiocolina + H<sub>2</sub>O  $\longrightarrow$  tiocolina + ácido butírico
  2. 2 tiocolina + 2 OH<sup>-</sup> + 2 hexacianoferrato (III) + 2O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  ditiobis (colina) + 2 hexacianoferrato (II) + H<sub>2</sub>O

### Procedimiento

La actividad BuChE se determinó utilizando el kit "Colinesterasa (CHE) butirilcolina" de Biosystems® de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Para obtener el suero, las muestras de sangre total se centrifugaron a 1250 rpm durante cinco minutos. Los restos de fibrina fueron removidos previamente de las paredes del tubo, evitando así la hemólisis de las muestras.

Para preparar el reactivo de trabajo se colocaron en un tubo 1200 µL del reactivo A con 300 µL de reactivo B y se precalentó a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 25 µL de suero, se mezcló y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA) a 405 nm cada 30 segundos, durante cuatro minutos. La actividad catalítica se reporta en U/L.

### 5.4 Determinación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)

#### Reactivos

- Buffer de fosfatos (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (0.1 M, pH 7.4)
- DNTB (10 mM)
- Etopropazina (6 mM)
- Tritón X-100 (0.03%)
- Yoduro de acetiltiocolina (28.3 mM)

## **Fundamento**

La actividad AChE fue determinada mediante el método propuesto por Worek et al. (1999). Se basa en la hidrólisis del sustrato acetilcolina por la enzima AChE. La tiocolina liberada reacciona con un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), dando lugar como producto de reacción al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo cuyo máximo de absorbancia se encuentra entre 405 y 420 nm de longitud de onda, con un óptimo en 412 nm.

La medición de la actividad AChE se realizó a 436 nm para reducir la absorción de hemoglobina en una cuarta parte con respecto a la lectura a 412 nm. Por otro lado, el uso de etopropazina garantiza la medición selectiva de la actividad de AChE, debido a que éste es un inhibidor selectivo de la BuChE. Con la finalidad de medir la actividad de AChE de manera más certera, se corrigió la actividad enzimática por el contenido de Hb en la muestra. La actividad de AChE se reporta en U/g de Hb.

## **Procedimiento**

Se realizó una dilución 1:100 de las muestras con el reactivo de dilución (tritón X-100). Se mezcló 0.5 mL de la dilución con 1 mL de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.4), 0.05 mL de DTNB (10 mM) y 0.005 mL de etopropazina (6 mM). Posteriormente la mezcla se incubó a 37 °C durante 10 minutos y se agregaron 0.025 mL de yoduro de acetilcolina (28.3 mM). El cambio de absorbancia a 436 nm fue monitoreado durante tres minutos. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA). La actividad AChE fue corregida por el contenido de hemoglobina y se expresó como U/g de Hb.

## **5.5 Determinación de hemoglobina (Hb)**

### **Reactivos**

- Reactivo de Drabkin (ferricianuro de potasio y cianuro de potasio)

## **Fundamento**

La concentración de Hb se determinó mediante el método de Drabkin. La Hb en sangre es transformada en cianometahemoglobina mediante la adición del reactivo de Drabkin. La metahemoglobina, oxihemoglobina, carboxihemoglobina y Hb son convertidas rápidamente a cianometahemoglobina, en donde, la reacción básica es convertir Hb en metahemoglobina por la conversión del hierro-ferroso a hierro-férrico con ferricianuro, y posteriormente provocar la unión de la metahemoglobina con cianuro formado así el pigmento de cianometahemoglobina. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de Hb presente en la muestra. La densidad óptica de la solución se mide a 540 nm.

## **Procedimiento**

La concentración de Hb se determinó a partir de 10  $\mu$ L de sangre total que se diluyeron en 2.5 mL de reactivo de Drabkin. Posteriormente se incubó 10 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA).

## **5.6 Evaluación de parámetros hematológicos**

La evaluación de los parámetros hematológicos se determinó en un laboratorio clínico certificado. Una vez realizado el muestreo, se etiquetaron las muestras con el folio de cada participante. Posteriormente, se realizaron alicuotas para cada una de las determinaciones e inmediatamente las muestras fueron llevadas al laboratorio para su análisis en un citómetro. A cada participante, se le determinó el grupo sanguíneo y se realizó una biometría hemática, donde se evaluó el contenido de hemoglobina, hematocrito, eritrocitos, linfocitos, leucocitos y plaquetas, entre otros.



## 5.7 Evaluación del fenotipo de PON1

### 5.7.1 Determinación de la actividad arilesterasa (ARE)

#### Reactivos

- Fenilacetato (10 mM)
- Tris-HCl (10 mM)
- Hemisulfato de eserina (40  $\mu$ M)
- $\text{CaCl}_2$  (1M)

#### Fundamento

La determinación de la actividad ARE se realizó por el método propuesto por Eckerson et al. (1983) y Furlong et al. (1988).

El fenilacetato es hidrolizado por la enzima PON1 y genera como producto fenol, la formación de este compuesto se monitorea a 270 nm y es proporcional a la cantidad de la enzima presente en la muestra. El sulfato de eserina se utiliza para inhibir la hidrólisis inespecífica por la albumina sérica, así como también por algunas colinesterasas séricas.

#### Procedimiento

La actividad ARE se determinó utilizando fenilacetato como sustrato. Se realizó una dilución del plasma 1:50 con agua destilada. Se mezclaron 20  $\mu$ L de la muestra diluida con 2.7 mL de buffer (Tris-HCl 10 mM, hemisulfato de eserina 40  $\mu$ M,  $\text{CaCl}_2$  1M, pH 8) y se incubaron cinco minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 300  $\mu$ L de fenilacetato (10 mM) como sustrato y se monitoreó el cambio de absorbancia a 270 nm a 37 °C cada minuto, durante cinco minutos. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA). La actividad enzimática se expresa en U/mL. El coeficiente de extinción molar del fenilacetato es de  $1.31 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 5.7.2 Determinación de la actividad CMPasa

### Reactivos

Tris-HCl (20 mM)

CaCl<sub>2</sub> (1 mM)

4-CMPA (3mM)

### Fundamento

La actividad CMPasa se determinó de acuerdo con el método propuesto por Richter et al. (2008) El 4-CMPA es hidrolizado por la enzima PON1 obteniendo como productos acetato y 4-clorometilfenol, la formación de este último compuesto se monitorea a 280 nm.

### Procedimiento

La actividad CMPasa se determinó utilizando 4-CMPA como sustrato. Se realizó una dilución de plasma 1:40 con buffer (Tris-HCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 8,0) y se realizó una mezcla con 60 µL de plasma diluido y 295.2 µL de buffer. Posteriormente se agregaron 304.8 µL (3mM) de 4-CMPA como sustrato y se midió inmediatamente el cambio de absorbancia a 280 nm durante cinco minutos a 25 °C. La actividad enzimática se midió en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA). La actividad enzimática se expresa en U/mL. El coeficiente de extinción molar del 4-CMPA es de 1.30 mmol/L<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 5.8 Evaluación del genotipo de PON1

### 5.8.1 Extracción y purificación del ADN

#### Reactivos

Kit "High Pure PCR Template Preparation kit" de Roche®

- Agua inyectable
- Isopropanol

### **Fundamento**

Consiste en la lisis celular mediante la incubación con proteinasa K en presencia de una sal caotrópica (HCl-guanidina), la cual inmediatamente inactiva a las nucleasas y evita la digestión de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se unen selectivamente a una fibra de vidrio pre-empacada en una mini-columna y se realizan lavados por centrifugación para eliminar componentes celulares que pudieran haberse adherido a la columna como contaminantes. Finalmente los ácidos nucleicos adheridos en la columna son eluidos con una solución de baja concentración de sales.

La concentración y pureza del ADN se determinó en un espectrofotómetro de luz UV-Visible modelo Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA), a 260 y 280nm. Para la concentración se consideró la relación de  $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de ADN = 1 D.O. La pureza se analizó mediante la relación de las absorbancias a 260 nm y 280 nm.

### **Procedimiento**

Para la extracción y purificación del ADN se utilizó el Kit "High Pure PCR Template Preparation kit" de Roche®. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de buffer de unión y 40  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a 200  $\mu\text{L}$  de sangre anticoagulada, se mezcló y se incubó a 70 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol y se agitó enérgicamente la mezcla, inmediatamente la mezcla se cambió a un tubo recolector con filtro, se centrifugó 8,200 rpm durante un minuto y se cambió el tubo colector. Después se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de buffer de inhibición se centrifugó a 8,200 rpm por un minuto y se cambió nuevamente el tubo recolector. Enseguida, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado, se centrifugó a 8,200 rpm durante un minuto y se desechó el sobrenadante. Se repitió cinco veces el lavado y en el último lavado, el tubo con filtro se cambió al tubo limpio y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 segundos para colectar el ADN. Finalmente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de buffer de elusión (precalentado a 70 °C)

y se centrifugó a 8,200 rpm durante un minuto. El sobrenadante obtenido corresponde al ADN purificado, el cual se conservó a 4 °C hasta su uso.

## 5.8.2 Integridad del ADN

### Reactivos

- TBE 1X
- Buffer de carga
  - Azul de bromofenol (3.6 mM)
  - Glicerol (3%)
  - Xilencianol (3.6 mM)
- Agarosa 1%
- Bromuro de etidio (5 µg/mL)

### Fundamento

La integridad del ADN se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. La electroforesis es una técnica de separación, basada en el movimiento o migración de las macromoléculas en un medio determinado, a través de una matriz o soporte como resultado de una acción en un campo eléctrico. La molécula transitará por el medio de acuerdo a su movilidad electroforética determinada por la carga y tamaño de la misma. Cuanto mayor es la relación carga/tamaño más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico. El ADN está cargado negativamente debido a la presencia de los grupos fosfatos, la migración en el campo eléctrico será del polo negativo al polo positivo. La visualización de la integridad se realiza mediante la tinción con bromuro de etidio. Este colorante se intercala entre las bases del ADN, de manera que el colorante unido al mismo emite una fluorescencia al ser excitado con luz UV en un transiluminador.

## Procedimiento

La integridad del ADN se determinó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio a 100 volts durante 30 minutos. Posteriormente se observó la integridad del ADN en el transiluminador de luz UV (Bio-Imaging Systems).

### 5.8.3 Determinación de los polimorfismos genéticos de PON1 55, PON1 192 y CYP2D6\*4 por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

#### Reactivos

- Sondas TaqMan® (Applied Biosystems®)
  - PON1 55 y PON1 192 (20X)
  - CYP2D6\*4 (40X)
- Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®) (2X)
- Agua inyectable

#### Fundamento

El sistema TaqMan® se basa en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq ADN polimerasa, que da lugar al rompimiento de las sondas marcadas con fluorocromos durante la PCR, para posteriormente medir la intensidad de fluorescencia. La sonda TaqMan® alinea entre los dos oligonucleótidos que flanquean el gen de interés. La temperatura de alineación de la sonda es 10° C mayor que la de los oligonucleótidos, lo cual permite la alineación de la sonda antes que los oligonucleótidos. Las sondas TaqMan® tienen dos moléculas fluorescentes (6-carboxifluoresceína, FAM y VIC). Ambas sondas tiene una segunda molécula denominada apagadora, lo que mantiene su espectro de emisión apagado, debido a la proximidad espacial de FAM o VIC, de tal manera que la fluorescencia total es igual a cero. La molécula fluorescente al estar espacialmente alejada de la molécula apagadora emite fluorescencia, misma que se incrementa cada vez que la sonda es degradada. De esta manera, el incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia está en relación directa con el producto amplificado.

## Procedimiento

La evaluación de los polimorfismos genéticos se realizó de acuerdo al método descrito por Rojas-García et al., (2005), mediante PCR-Tiempo Real en un equipo StepOne™ 2.1 Software de Applied Biosystems utilizando el sistema TaqMan® Universal PCR Master Mix. Las sondas fueron diseñadas con el software Primer Express® y marcadas con los reporteros fluorescentes FAM y VIC. La secuencia de los oligonucleótidos y las sondas se muestran en la **Tabla 1**. La mezcla de reacción contenía: 7.07 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix 1X (enzima Amplitaq Golden DNA Polymerase, Amperase UNG, dNTP's con dUTP, una molécula fluorescente como referencia pasiva), 0.35 µL de la mezcla de oligonucleótidos-sondas TaqMan (1X), 2 µL de ADN genómico (50 ng) en un volumen final de 15 µL. Las condiciones de aplicación fueron: una temperatura inicial de 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min y 40 ciclos de 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min. Al término de la reacción se realizó el análisis de discriminación alélica.

## 5.9 Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución normal de las variables dependientes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) cuando los datos siguieron una distribución normal, y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar más de dos grupos cuando los datos no fueron distribuidos normalmente. Asimismo, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre poblaciones. Los coeficientes de correlación se calcularon con la prueba de Spearman para examinar la correlación entre las colinesterasas y las actividades de PON1. Para analizar la modulación de la actividad AChE por los fenotipos y genotipos de PON1 se realizó un análisis de regresión lineal.

Para analizar si los polimorfismos genéticos estaban de acuerdo con la ley de Hardy-Weinberg se aplicó una prueba de ji-cuadrada. Para calcular el desequilibrio genético entre los polimorfismos y la asociación genética entre genotipos y frecuencias alélicas, se utilizó el software SNPStats (<http://bioinfo.iconcoologia.net/SNPstats>). Se consideró

una diferencia estadísticamente significativa aquella con valor de  $p < 0.05$ . Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico STATA versión 8.0 (Stata Corp LP, College Station, Texas, USA).



**Tabla 1.** Secuencia de oligonucleótidos y sondas TaqI

Número de acceso	Polimorfismo	Sonda TaqMan	Oligonucleótidos
rs854560	PON1 55	VIC AGTATCTCCAAGTCTTC	ACAACCTGTACTTTTCTGTTCTCTTTTCTG/
		FAM CAGTATCTCCATGTCTTC	CAGAGCTAATGAAAGCCAGTCCAT
rs662	PON1 192	VIC CCTACTTACAATCCTG	CTGAGCACTTTTATGGCACAAATGA/
		FAM CCCTACTTACGATCCTG	ACCACGCTAAACCCAAATACATCTC
rs3892097	CYP2D6*4	VIC CCCCAGGACGCC	ACCCCTTACCCGCATCTC
		FAM CCCCCAAGACGCC	CTCACGGCTTTGTCCAAGA

Las secuencias están reportadas en sentido 5'-3'



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características generales de la población de estudio

La población comprendió mujeres (56%) y hombres (44%) indígenas huicholes con una media geométrica de 35.7 años de edad. El 48% de la población total tenía un índice de masa corporal (IMC) considerado como normal para una población mexicana, el mayor porcentaje de individuos con sobrepeso se observó en el grupo expuesto (52%). La distribución de la edad, tiempo de trabajo en el campo, educación y hábitos nocivos se presenta en la **Tabla 2**.

No se observaron diferencias en estas variables entre los grupos de estudio. El 42.86% de la población expuesta, tenía más de 15 años trabajando en el campo, de los cuales el 90% realizaba actividades como siembra, cosecha, corte y ensarte de tabaco, además de aplicar y mezclar plaguicidas. Por otro lado, el 74% de los trabajadores no sabe qué plaguicidas ha utilizado y el 26% utiliza más de un plaguicida a la vez. Los jornaleros del grupo expuesto trabajan en promedio 8 horas por día con un rango de 1 a 10 horas y 6 días a la semana.

Los plaguicidas más comúnmente utilizados por los jornaleros fueron los POF (60%), seguidos de herbicidas como el glifosato (**Tabla 3**). Más del 50% de los plaguicidas que utilizan pertenecen a los grupos 1A (extremadamente peligroso) y 1B (altamente peligrosos) de acuerdo con la OMS (OMS, 2004).

Por otro lado, más del 50% de los trabajadores informaron que no utilizaban ningún equipo de protección durante el trabajo en el campo. En este sentido, 16% de los participantes habían tenido al menos un episodio de intoxicación. Asimismo, los trabajadores informaron tener síntomas durante la jornada laboral tales como dolor de cabeza (82.35%), mareos (75%), ardor en los ojos (68%), dolor de estómago

(69.12%), sensación de vómitos (54%), ardor y picazón de piel (35.29%) y salivación excesiva (40.91%).

**Tabla 2.** Características antropométricas de la población de estudio

Características	Controles n=62	Expuestos n=64	Valor de p
<b>Sexo (%)</b>			
Mujeres	56.45	57.81	0.87
Hombres	43.55	42.19	
<b>Edad (%)</b>			
18-24	20.96	20.31	
25-34	30.64	26.56	0.86
35-49	27.41	34.37	
≥50	20.96	18.75	
<b>IMC (%)</b>			
Normal	48.08	48	
Sobrepeso	36.54	52	0.085*
Obesidad	15.38	-	
<b>Hábito de fumar (%)</b>	12	-	0.13*
<b>Consumo de alcohol (%)</b>	48.8	38.9	0.18
<b>Años de trabajo en el campo (%)</b>			
≤1	-	-	
2-3	-	21.43	
4-5	-	7.14	
6-10	-	21.43	
11-15	-	7.14	
≥15	-	42.86	

Normal: 18.50-24.99 (Kg/m<sup>2</sup>), sobrepeso: 25.00-29.99 (Kg/m<sup>2</sup>), obesidad: ≥ 30 (Kg/m<sup>2</sup>). El valor de p se obtuvo con la prueba de ji-cuadrada. El valor de \*p se obtuvo con la prueba exacta de Fisher.

**Tabla 3.** Plaguicidas más utilizados por la población de estudio

Nombre comercial	Grupo químico	Uso	Clasificación toxicológica
<b>Azinfos-metil</b>	Organofosforado	Insecticida	IB
<b>Chlorpirifos etil</b>	Organofosforado	Insecticida	III
<b>Diazinon</b>	Organofosforado	Insecticida	IA
<b>Malation</b>	Organofosforado	Insecticida	III
<b>Metil paration</b>	Organofosforado	Insecticida	IA
<b>Terbufos</b>	Organofosforado	Insecticida	IA
<b>Lannate 90</b>	Carbamato	Insecticida	IB
<b>Esteron</b>	Ácido-diclorofenoxiacético (2-4-D)	Herbicida	III
<b>Glifosato</b>	N-fosfonometilglicina	Herbicida	IV
<b>Dicloruro de Paraquat</b>	Dipiridilos	Herbicida	IA

Clasificación toxicológica de la OMS (2004): Clase IA-extremadamente peligroso, clase IB-altamente peligroso, clase II-moderadamente tóxico, clase III-ligeramente tóxico, clase IV-poco tóxico, clase V-prácticamente no tóxico.

## 6.2 Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas

### 6.2.1 Colinesterasas

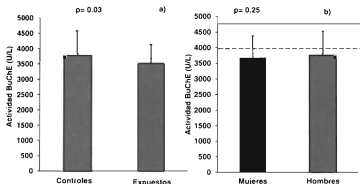
La actividad BuChE se muestra en la **Figura 3**. El promedio de la actividad BuChE en ambas poblaciones fue de 3695.11 U/L $\pm$ 745.86 por debajo de los valores considerados como normales para una población mexicana (3930-10800 U/L en las mujeres, 4620-11500 U/L en los hombres). Los jornaleros expuestos a plaguicidas presentaron menor actividad BuChE (3498.80 U/L $\pm$ 632.66) en comparación con la población control (3754.43 U/L $\pm$ 825.32).

Respecto al género, no se encontraron diferencias ( $p= 0.25$ ) en esta actividad, sin embargo, 74% de las mujeres y 87% de los hombres presentaron niveles por debajo de los normales en la actividad BuChE (Figura 3).

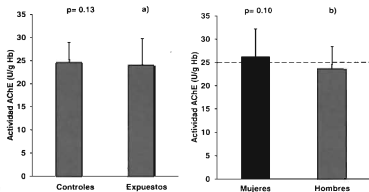
Por otra parte, el valor promedio de la actividad AChE en la población de estudio fue de  $24.63 \text{ U/g Hb} \pm 5.29$ , ligeramente inferior a los valores considerados como normales en una población mexicana (25-45 U/g Hb). No se observó diferencia entre individuos expuestos y controles ( $p= 0.13$ ) (Figura 4). Asimismo, no se observaron diferencias en la actividad AChE respecto al género ( $p= 0.10$ ), sin embargo, el 50% de las mujeres y 60% de los hombres presentaron actividad AChE por debajo de los niveles normales reportados en poblaciones mexicanas.

#### 6.2.2 Parámetros hematológicos

Para evaluar el efecto de los plaguicidas sobre los parámetros hematológicos se realizó recuento de glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, plaquetas y leucocitos totales, entre otros útiles en la valoración del estado de salud (Tabla 4). De acuerdo con los resultados, el contenido de eritrocitos fue inferior al valor considerado como normal para la población mexicana. Las mujeres de la población no expuesta tuvieron menor contenido de hemoglobina y de eritrocitos que las expuestas a plaguicidas ( $p < 0.05$ ). Los trabajadores expuestos a plaguicidas tuvieron niveles más bajos de leucocitos pero mayores niveles de linfocitos con respecto al grupo control.



**Figura 3.** Actividad BuChE en la población, de acuerdo con el grupo de estudio (a) y género (b). La líneas indican los niveles considerados como normales en mujeres (punteada) y hombres (continua) mexicanos. El valor de p se obtuvo con la prueba U de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.



**Figura 4.** Actividad AChE en la población, de acuerdo con el grupo de estudio (a) y género (b). La línea punteada indica los niveles considerados como normales para una población mexicana. El valor de p se obtuvo con la prueba U de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

**Tabla 4.** Parámetros hematológicos en la población de estudio

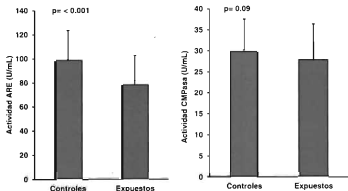
Parámetro	Controles $\bar{X} \pm DE$ (rango)	Expuestos $\bar{X} \pm DE$ (rango)	Valor de p	Valores de referencia
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>				
Mujeres	11.86 $\pm$ 1.31 (6.2-13.7)	12.52 $\pm$ 1.14 (9.8-15.1)	<b>0.0355<sup>a</sup></b>	12.5-16.8
Hombres	13.67 $\pm$ 1.06 (10.2-15.3)	13.94 $\pm$ 0.99 (12-15.5)	0.3496 <sup>a</sup>	13.5-18.0
<b>Eritrocitos (<math>10^6/mm^3</math>)</b>				
Mujeres	4.15 $\pm$ 0.24 (3.74-4.67)	4.35 $\pm$ 0.35 (3.57-5.02)	<b>0.0064<sup>a</sup></b>	4.8 $\pm$ 0.6
Hombres	4.55 $\pm$ 0.42 (3.38-5.24)	4.62 $\pm$ 0.33 (3.97-5.13)	0.4716 <sup>a</sup>	5.4 $\pm$ 0.9
<b>Hematocrito (%)</b>				
Mujeres	38.10 $\pm$ 3.66 (23.5-44.8)	39.70 $\pm$ 3.26 (33.7-47.8)	0.0997 <sup>b</sup>	33-47
Hombres	43.11 $\pm$ 2.89 (36.1-47.6)	43.71 $\pm$ 2.97 (37.9-48.7)	0.4210 <sup>b</sup>	40-54
<b>Leucocitos (<math>10^3/mm^3</math>)</b>				
Mujeres	8.08 $\pm$ 1.67 (5.6-14.3)	6.61 $\pm$ 1.65 (3.8-11.7)	<b>0.0002<sup>b</sup></b>	5,000-10,000
Hombres	8.23 $\pm$ 2.09 (4.8-12.2)	7.10 $\pm$ 1.65 (4.1-10.7)	<b>0.05<sup>b</sup></b>	
<b>Linfocitos (%)</b>				
Mujeres	32.56 $\pm$ 7.58 (16.9-49.1)	36.21 $\pm$ 7.67 (16.2-58.7)	<b>0.0004<sup>a</sup></b>	20-30
Hombres	33.38 $\pm$ 6.27 (18.3-48.3)	35.72 $\pm$ 7.95 (22.2-54.8)	<b>0.0325<sup>a</sup></b>	
<b>Plaquetas (<math>10^3/mm^3</math>)</b>				
Mujeres	249.44 $\pm$ 65.76 (139-483)	259.40 $\pm$ 64.24 (127-392)	0.3250 <sup>b</sup>	150,000-400,000
Hombres	195.92 $\pm$ 40.38 (135-268)	219.55 $\pm$ 46.64 (129-344)	0.0899 <sup>b</sup>	

<sup>a</sup> Prueba t de Student, <sup>b</sup> U de Mann-Whitney

### 6.2.3 Fenotipo de PON1

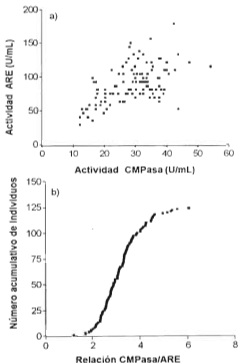
Los resultados de la actividad de la PON1 utilizando como sustrato al fenilacetato (actividad ARE) y 4-CMPA (actividad CMPasa) se muestran en la **Figura 5**. El promedio de la actividad ARE en la población indígena fue de  $87.83 \text{ U/mL} \pm 27.18$ , y fue la población expuesta a plaguicidas la que presentó menor actividad ( $73.81 \text{ U/mL} \pm 24.88$ ) con respecto al grupo control ( $94.52 \text{ U/mL} \pm 25.91$ ) ( $p < 0.0001$ ). Cuando se estratifico la actividad de acuerdo al género no se observaron diferencias en la misma ( $p = 0.38$ ).

El promedio de la actividad utilizando como sustrato 4-CMPA fue de  $28.58 \text{ U/mL} \pm 8.41$ , y se observó que la población expuesta ( $26.09 \text{ U/mL} \pm 8.78$ ) presentó una tendencia a tener menor actividad CMPasa que el grupo de referencia ( $28.46 \text{ U/mL} \pm 7.96$ ) ( $p = 0.09$ ). Tampoco, se observaron diferencias en la actividad de acuerdo al género ( $p = 0.53$ ).



**Figura 5.** Fenotipo de PON1, actividad ARE (a), actividad CMPasa (b). El valor de p se obtuvo con la prueba t de Student. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

Además se observó una gran variabilidad en la actividad de PON1 entre la población de estudio (Figura 6a). Cuando se graficó el número acumulativo de individuos versus la tasa de ARE/CMPasa, se observó un comportamiento bimodal (Figura 6b), como se ha descrito para otras poblaciones.



**Figura 6.** Actividad de PON1 (CMPasa/ARE). Actividad de PON1 con fenilacetato y 4-CMPA (a), número acumulativo de individuos versus la tasa de actividad de PON1 (CMPasa/ARE) (b).



También se observó una correlación entre la actividad BuChE con la actividad ARE y la actividad AChE con CMPasa. Además, como se esperaba, se observó una correlación de la actividad de PON1 a través de los dos sustratos utilizados (fenilacetato y 4-CMPA) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Correlación entre colinesterasas y actividad de PON1

	BuChE	AChE	ARE	CMPA
BuChE	1			
AChE	-0.0207 p= 0.820	1		
ARE	0.2358 p= <b>0.0092</b>	0.0869 p= 0.3392	1	
CMPA	0.1360 p= 0.1337	0.2023 p= <b>0.0237</b>	0.5679 p= <b>&lt;0.0001</b>	1

n=126. La correlación se obtuvo con la prueba de Spearman. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

#### 6.2.4 Genotipo de PON1

La **Tabla 6** muestra las frecuencias alélicas y genotípicas de PON1 observadas en la población indígena huichol. Los alelos L (0.97) y R (0.59) fueron los más frecuentes en esta población. El genotipo más frecuente para el polimorfismo de PON1 55, fue el homocigoto LL (0.94), seguido del heterocigoto LM (0.05) y el menos frecuente fue el homocigoto MM (0.01). En el caso de PON1 192, el genotipo más frecuente fue el heterocigoto RQ (0.42), seguido del homocigoto RR (0.38) y el homocigoto QQ (0.20). No se encontraron diferencias en los polimorfismos de PON1 55 y 192 entre los grupos de estudio ( $p > 0.05$ ). Las frecuencias genotípicas observadas en este estudio se encontraron en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg.

**Tabla 6.** Frecuencias genotípicas y alélicas de PON1

Polimorfismo genético de PON1		
	55 (L/M)	192 (R/Q)
Genotipo	MM (0.01)	QQ (0.20)
	LM (0.05)	RQ (0.42)
	LL (0.94)	RR (0.38)
Alelo	L (0.97)	R (0.59)
	M (0.03)	Q (0.40)

n=126. \*Las frecuencias alélicas se obtuvieron mediante la fórmula de Hardy-Weinberg.

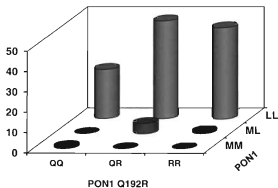
### 6.2.5 Desequilibrio genético de PON1

Se observó un desequilibrio genético entre las frecuencias encontradas en los polimorfismos genéticos de PON1 55 y 192 ( $D' = 0.60$ ,  $p = 0.03$ ). Las frecuencias de los diplotipos de PON1 55 y 192 se muestran en la **Figura 7**. El diplotipo más frecuente en esta población fue LL/QR, seguido de LL/RR y LL/QQ. En esta misma figura se observa una ausencia de diplotipos MM/RR, MM/QR y ML/QQ.

### 6.2.6 Relación fenotipo-genotipo de PON1 y su relación con las colinesterasas

En la **Tabla 7** se muestran las actividades de PON1 con ambos sustratos de acuerdo con los diferentes genotipos. Los resultados muestran que la actividad de PON1 con 4-CMPA fue diferente ( $p < 0.05$ ) entre los genotipos de PON1 192 y marginalmente significativa para los genotipos de PON1 55. También se observó una diferencia en la actividad CMPasa entre los diplotipos de PON1 55 y 192. Para el caso de la actividad ARE, no se observaron diferencias entre genotipos ni diplotipos en esta población.

Por otro lado, no se observó una relación entre las actividades BuChE o AChE y los genotipos y diplotipos de PON1 ( $p > 0.05$ ).



**Figura 7.** Frecuencias de diplotipos de PON1 en la población de estudio (n=126).

### 6.2.7 Fenotipo y genotipo como predictores de AChE

Sólo el fenotipo de PON1 utilizando 4-CMPA como sustrato se asoció positivamente con la actividad AChE (**Tabla 8**).

Tabla 7. Relación fenotipo, genotipo de PON1 y colinesterasas en la población de estudio

Sitio polimórfico (n)	Controles					Expuestos						
	BUCHE (U/L)	ACHE (U/g Hb)	ARE (U/mL)	CMPasa (U/mL)	BuCHE (U/L)	ACHE (U/g Hb)	ARE (U/mL)	CMPasa (U/mL)	BuCHE (U/L)	ACHE (U/g Hb)	ARE (U/mL)	CMPasa (U/mL)
<b>55</b>												
MM (1)	3825	23	52	12.86	-	-	-	-	-	-	-	-
ML (6)	3875.3±177.8	22.66±2.1	82.6±6.6	27.1±9.6	3408±796.9	20.82±5.49	59.6±26.55	18.95±6.20	-	-	-	-
LL (117)	3834.5±853.0 p=0.63 <sup>b</sup>	24.98±4.65 p=0.28 <sup>b</sup>	99.3±25.7 p=0.1128 <sup>a</sup>	30.0±7.6 p=0.08 <sup>a</sup>	3519.2±572.7 p=0.61 <sup>b</sup>	24.45±5.82 p=0.27 <sup>b</sup>	79.19±24.83 p=0.1906 <sup>a</sup>	20.09±8.58 p=0.07 <sup>a</sup>	-	-	-	-
<b>192</b>												
QQ (25)	4660.4±1086.9	24.2±3.4	96.1±39.9	27.13±9.2	3613.6±622.6	24.2±6.1	66.8±25.7	20.3±6.8	-	-	-	-
RQ (52)	3800±728.5	24.8±5.1	97.8±25.1	27.08±5.8	3365.6±543.6	23.6±5.4	78.4±26.6	26.4±7.2	-	-	-	-
RR (47)	3784.1±818.7 p=0.86 <sup>b</sup>	25.1±4.5 p=0.66 <sup>b</sup>	98.5±21.0 p=0.96 <sup>a</sup>	34.15±7.9 p=0.0026 <sup>a</sup>	3693.9±691.4 p=0.28 <sup>b</sup>	25.3±6.4 p=0.76 <sup>b</sup>	83.2±21.6 p=0.15 <sup>a</sup>	32.3±8.3 p=0.0001 <sup>a</sup>	-	-	-	-
<b>55/192</b>												
MM/qq (1)	3825	23	52	12.86	-	-	-	-	-	-	-	-
ML/Qr (6)	3975.3±177.8	22.6±2.08	82.6±6.6	27.1±9.6	2961±267.3	22.2±6.9	52±32.5	18.3±6.6	-	-	-	-
ML/RR (1)	-	-	-	-	43.02	18.01	75	20.31	-	-	-	-
LL/qq (24)	4084±1142.8	24.3±3.55	100.1±34.7	28.4±8.4	3613.6±622.7	24.2±6.1	66.8±25.7	20.3±6.8	-	-	-	-
LL/Qr (48)	3779.1±768.2	25.1±5.3	99.7±25.9	27.1±5.5	3402.3±550.6	23.7±5.4	80.8±25.6	27.1±6.8	-	-	-	-
LL/RR (45)	3784.1±818.7 p=0.83 <sup>b</sup>	25.1±4.5 p=0.58 <sup>b</sup>	98.5±21.4 p=0.36 <sup>a</sup>	34.1±7.9 p=0.0031 <sup>a</sup>	3581.7±571.9 p=0.23 <sup>b</sup>	25.3±6.2 p=0.65 <sup>b</sup>	84.9±21.9 p=0.15	33.4±7.4 p<0.0001 <sup>a</sup>	-	-	-	-

Los valores son el promedio ± DE, p < 0.05 fue aceptado como estadísticamente significativa. <sup>a</sup>p se obtuvieron mediante ANOVA, los valores de <sup>b</sup>p se obtuvieron mediante la prueba Kruskal.

**Tabla 8.** Fenotipo y genotipo de PON1 como predictores de la actividad AChE

	Valor $\beta$	Valor de p
<b>Actividad CMPasa</b>	0.006	<b>0.02</b>
<b>Actividad ARE</b>	-0.0004	0.61
<b>PON1 55ML</b>	0.041	0.54
<b>PON1 192QR</b>	-0.007	0.79

n=126 \*p obtenido de un análisis de regresión lineal.

### 6.2.8 Polimorfismo genético del CYP2D6\*4

La frecuencia alélica del CYP2D6\*4 observada fue de 0.06 y de 0.94 para el alelo silvestre (Sil). El genotipo más frecuente fue Sil/Sil, seguido del Sil/\*4 y el menos frecuente fue el \*4/\*4 (Tabla 9). No se encontraron diferencias en el polimorfismo del CYP2D6\*4 entre los grupos de estudio ( $p > 0.05$ ). Las frecuencias genotípicas observadas se encontraron en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg.

**Tabla 9.** Frecuencias genotípicas y alélicas del CYP2D6\*4 en la población de estudio

	CYP2D6*4
<b>Genotipo</b>	Sil/Sil (0.88)
	Sil/*4 (0.11)
	*4/*4 (0.003)
<b>Alelo</b>	Sil/Sil (0.94)
	*4/*4 (0.06)

n=12. \*Las frecuencias alélicas se obtuvieron mediante la fórmula de Hardy-Weinberg.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Jornaleros indígenas huicholes

Los huicholes es una de las etnias con mayor presencia en el estado de Nayarit, debido al aislamiento en el que han vivido, son de los grupos indígenas genética, cultural y tradicionalmente más conservados en México (Neurath, 2003; INEGI, 2010). Las ceremonias más importantes de los huicholes están estrechamente relacionadas con el ciclo agrícola, por lo que su presencia en los campos agrícolas obedece en parte al apego de sus creencias. Lo anterior, constituye sin duda una riqueza cultural para nuestro país y al mismo tiempo representa un reto poder realizar estudios de biomarcadores toxicológicos en estas poblaciones. Uno de los principales desafíos es el seguimiento de los jornaleros indígenas, ya que la mayoría al no contar con identificaciones oficiales se cambian de nombre cada temporada. Además debido a sus creencias es difícil que acepten donar muestras de sangre, para la evaluación de biomarcadores, aún así, en este estudio la tasa de participación fue del 60% y las mujeres representaron al mayor número de participantes (55%).

Los jornaleros huicholes tienen un mayor riesgo de exposición a plaguicidas debido a diversos factores, entre ellos el analfabetismo, lo cual no les permite leer las instrucciones y precauciones impresas en las botellas de plaguicidas, en consecuencia el conocimiento de los efectos tóxicos de estos compuestos es escaso o nulo, de ahí que resulta evidente que el 74% de los trabajadores no sabe el tipo de plaguicidas que utiliza y 90% refirieron no haber recibido capacitación o información acerca del uso de estos compuestos. Aunado a lo anterior, debido a sus creencias y al clima caluroso de la región, la mayoría los jornaleros no usa equipo de protección adecuado. Con los datos obtenidos en este trabajo se puede inferir que muchos de estos trabajadores presentan una historia de exposición ocupacional crónica a plaguicidas, pues el 40% de la población de estudio refirió tener 15 años de trabajar en el campo e incluso algunos trabajadores más de 50 años. Adicional a los factores

descritos anteriormente, los jornaleros viven y laboran en los campos agrícolas en condiciones que favorecen la exposición, pues una vez contratados construyen sus casas dentro de los campos de cultivo, la mayoría de las viviendas son de una sola habitación, la cual sirve de dormitorio, cocina y almacén de granos y utilería para la agricultura (CDI, 2010).

## 7.2 Colinesterasas como biomarcadores toxicológicos

En este estudio se observó una disminución en la actividad BuChE en los individuos expuestos a plaguicidas (3498.80 U/L) respecto a los controles (3754.43 U/L). Estos resultados son similares a los reportados por Araoud et al. (2010) en trabajadores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas en Sahel, Túnez. Zhou et al. (2007) reportaron también una disminución en la actividad BuChE en trabajadores crónicamente expuestos a POF, además se ha observado que cuando los trabajadores están continuamente expuestos, por ejemplo, con una frecuencia semanal, la recuperación de la actividad BuChE está reprimida (Hernández et al., 2006).

Con respecto a la actividad de AChE, no se observaron diferencias entre los grupos de estudio. Sin embargo, el 55% de la población total mostró niveles de actividad AChE por debajo de lo normal para una población mexicana (25-45 U/g de Hg). En este sentido, se ha descrito, que a diferencia de la AChE, la BuChE es más sensible pero menos específica ante la exposición a POF (Podolak y Panasiuk, 1997; Jaga y Dharmani, 2003; Rojas-García et al. 2011). Soltaninejad et al. (2007) reportaron una disminución en la actividad BuChE con ausencia de efecto sobre la AChE en individuos intoxicados con POF. Asimismo, Jintana et al. (2009), reportó que el efecto de la exposición a POF sobre las colinesterasas fue predominante sobre la actividad de la BuChE. Una de las posibles razones es que el potencial de la inhibición de la AChE y BuChE varía ampliamente entre los diferentes POF (He, 1999; Hernández et al., 2006; Jintana et al., 2009).

Al respecto, El Instituto Nacional de Salud Pública de México reportó una actividad de AChE de 28.27 U/g Hb en jornaleros indígenas huicholes expuestos a contaminantes en los campos agroindustriales de la costa de Nayarit (Gamlin et al., 2007), sin encontrar diferencias significativas en la actividad AChE medida durante la cosecha entre los trabajadores que estaban en contacto con plaguicidas (28.27 U/g Hb) y los que no (30.39 U/g Hb). Por otro lado, Gamlin et al. (2007) evaluaron la actividad AChE en un estudio longitudinal en 62 niños que trabajaban en plantaciones de tabaco, durante la temporada de cosecha en el estado de Nayarit y encontraron que el 33% de las muestras pareadas (durante la cosecha *versus* 6-9 meses después de la cosecha) tenía una disminución en la actividad de AChE de al menos 15% durante el período de exposición intensiva.

En este estudio no se observó una asociación entre la actividad de las colinesterasas y la sintomatología que presentaban los jornaleros indígenas, esto difiere con lo reportado por Hernández et al. (2004) y Remor et al. (2009) en individuos expuestos a POF, quienes observaron una fuerte asociación entre la exposición a estos compuestos, los síntomas y la disminución en la actividad de las colinesterasas. También, se han reportado estudios donde se describe la presencia de síntomas como cefalea, irritabilidad, insomnio y debilidad sin alteración de las colinesterasas o con una disminución discreta (Nicole et al., 2003).

Es importante tener en cuenta que no existen valores de referencia para la actividad BuChE en esta población en particular, y posiblemente sus valores de referencia sean menores a los reportados en otras poblaciones, no obstante, los individuos expuestos a plaguicidas presentaron menor actividad BuChE con respecto al grupo control.



### 7.3 Exposición a plaguicidas y daño hematológico

Es escasa la literatura en la que se evalúa el daño hematológico asociado con exposición a plaguicidas en poblaciones humanas. En este estudio, el 42% de los participantes presentó una disminución en el contenido de Hb y 82% presentó niveles bajos de eritrocitos. También, se observó una disminución de leucocitos y un aumento en los linfocitos en los jornaleros expuestos con respecto al grupo control. Remor et al. (2009) reportaron una disminución de leucocitos y un aumento en los linfocitos en trabajadores agrícolas de dos comunidades de Rio Grande do Sul, Brasil, expuestos a mezclas complejas de plaguicidas. Algunos estudios han reportado sólo niveles bajos de leucocitos en los trabajadores expuestos en comparación con los controles (Samuels y Milby, 1971; Al-Sarar et al., 2009; Hernández et al., 2005) o sólo un aumento de los linfocitos en individuos expuestos a plaguicidas (Al-Sarar et al., 2009), los autores sugieren que la leucopenia puede considerarse como un índice de exposición crónica a plaguicidas. Los estudios en modelos animales también son consistentes con estos resultados; Aportela-Gilling et al. (2001) encontraron que la exposición a los POF en ratones disminuye la cantidad de leucocitos. En otros estudios no se observaron diferencias en los parámetros hematológicos evaluados entre poblaciones expuestas a plaguicidas y controles (Pastor et al., 2002 Remor et al., 2003). Estas inconsistencias pueden atribuirse al tipo de plaguicida utilizado, a la frecuencia y tipo de exposición.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este estudio no mostraron asociación entre la presencia de síntomas, parámetros bioquímicos y alteraciones hematológicas, lo anterior es consistente con otros estudios descritos en la literatura (Davington et al., 1965; Samuels y Milby et al., 1971; Albiano et al., 1986; Sarabia-Núñez et al., 1998).

#### 7.4 Fenotipo de PON1

La relación entre fenotipo/genotipo de PON1 y la toxicidad por POF ha sido caracterizada en varios estudios (Li et al., 2000; Costa et al., 2005; Cole et al., 2005; Richter et al., 2009; Singh et al., 2011). El interés en PON1 surgió de la hipótesis de que los individuos con baja actividad sérica de esta enzima, tienen menor capacidad para metabolizar POF y por ende menor detoxificación (Sarabia-Nuñez et al., 1998).

En el presente estudio, se evaluó el fenotipo de PON1 utilizando como sustrato al fenilacetato y al 4-CMPA en una población indígena huichol. Hasta el momento, no hay estudios que evalúen la actividad de PON1 en este tipo de poblaciones. Como se describió en la sección de resultados, la población huichol mostró una amplia variabilidad en la actividad de la PON1, de 6.17 veces cuando se utilizó fenilacetato como sustrato y 4.4 veces cuando se utilizó 4-CMPA. Esta variación es consistente con otros estudios de diferentes poblaciones en las que se reportan variaciones de hasta 40 veces la en la actividad plasmática y diferencias de hasta 13 veces en la actividad sérica entre individuos con el mismo genotipo (Richter et al., 1999; Costa et al., 2005; Cataño et al., 2006; Sepahvand et al., 2007; Phuntuwate et al., 2005). Asimismo, la gran variabilidad interindividual de la actividad de PON1 observada en este trabajo es consistente con la reportada en otras poblaciones mexicanas (Rojas-García et al., 2005).

Por otro lado, en un estudio realizado por Richter et al. (2008) se reporta que más de 70 compuestos fueron analizados para identificar los mejores sustratos y condiciones de ensayo, que proporcionarán la misma resolución de los fenotipos de PON1 192 como el par de sustratos tóxicos diazoxón/paraoxón, se observó que de todos los sustratos utilizados, la hidrólisis de fenilacetato (2 mol/L) y 4-CMPA, fueron la mejor resolución para los fenotipos de PON1 192. Al respecto, aunque los resultados en este estudio no mostraron una clara resolución, la actividad CMPasa parece ser más sensible que la actividad ARE, dado que la actividad CMPasa fue el único predictor

significativo de AChE. Además, se observó que la actividad CMPasa fue diferente entre los genotipos y diplotipos de PON1.

## 7.5 Genotipo de PON1

Diversos estudios han evaluado polimorfismos genéticos presentes en las enzimas que biontrasforman xenobióticos (Liu et al., 2006; Heuser et al., 2007; Da Silva et al., 2008; Singh et al., 2011). Al respecto, se ha relacionado al polimorfismo genético de PON1 en la posición 55 con diferencias en la actividad de esta enzima. Así también, se ha propuesto que el polimorfismo en la posición 192 tiene un efecto significativo sobre la capacidad hidrolítica de la PON1 (Harel et al., 2004; Rojas-García y Velázquez-Fernández, 2010).

En este estudio, los alelos más frecuentes fueron el L (0.97) y R (0.59), mismos que están relacionados con una mayor capacidad de detoxificación de POF, resultados similares se han observado en otras poblaciones (**Tabla 10**). La frecuencia alélica de PON1 55 fue similar a la encontrada en una población de indígenas mayas (L, 0.95), tenek (L, 0.98) y china (L, 0.95); mientras que la frecuencia alélica de PON1 192 encontrada en este estudio fue similar a la reportada en una población japonesa (R, 0.60), malaya (R, 0.59), tailandesa (R, 0.61), benineses (R, 0.61) y china (R, 0.59), pero diferente a las poblaciones de Estados Unidos o Europa (Suheshiro et al., 2000; Wang et al., 2003; Cataño et al., 2006). Sin embargo, las frecuencias alélicas de PON1 55 y 192 variaron con respecto a las reportadas en poblaciones de mestizos mexicanos (Sen-Banerjee et al., 2000; Allebrandt et al., 2002; Chen et al., 2003; Rojas-García et al., 2005; Gamboa et al., 2006; López-Flores et al., 2009). Estos datos apoyan la hipótesis de que los indígenas amerindios y asiáticos comparten un origen ancestral común. Tal vez, sea la razón de que las poblaciones de América y Asia muestran afinidades genéticas fuertes (Furlong et al., 2002; Scacchi et al., 2003; Phuntuwate et al., 2005; Rojas-García et al., 2005; Liu et al., 2006; Sepahvand et al., 2007).

Las frecuencias genotípicas de PON1 55 y 192 estuvieron en equilibrio con la ley de Hardy-Weinberg. Con lo anterior, se garantiza: 1) que el número de individuos en el estudio, fue suficientemente grande como para que los errores de muestreo no influyan en las frecuencias encontradas; 2) que no existe selección entre los diferentes genotipos, es decir, que tienen la misma capacidad de sobrevivir y de reproducción; 3) no hay mutaciones que originen la conversión de un alelo en otro; y 4) que no existe migración que modifique las frecuencias en la población (Klug y Cummings, 2000).

### **7.6 Relación fenotipo-genotipo de PON1**

La actividad PON1 puede ser modulada por factores ambientales, como la exposición a plaguicidas (Blatter-Garin et al., 1997; Costa et al., 2005). En este estudio los genotipos de PON1 y la exposición fueron factores que modularon el fenotipo de PON1. Al respecto, se observó una disminución en la actividad CMPasa en el siguiente orden RR/LL>LL/QR>LL/QQ>ML/RR>ML/QR>MM/QQ. Los resultados fueron consistentes con los reportados en otros estudios en los que se utilizó como sustrato al fenilacetato (Humbert et al., 1993; Li et al., 2000; Scacchi et al., 2003; Rojas-García et al., 2005; Cataño et al., 2008). Por otro lado, en este estudio no se observó variación significativa en la actividad ARE asociada con los polimorfismos PON1 55 ó 192, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (Humbert et al., 1993; Cataño et al., 2006; Sepahvand et al., 2007; López-Flores et al., 2009; Singh et al., 2011).

**Tabla 10.** Frecuencia alélica de PON1 en poblaciones humanas

	Población	Frecuencia alélica		Referencia
		55 L	192 R	
<b>África</b>	Beninés	ND	0.61	Scachhi et al., 2003
	Etiope	ND	0.40	Scachhi et al., 2003
<b>América</b>	Afro-américa	0.83	0.71	Chen et al., 2003
	Americana	0.65	0.30	Brophy et al., 2000
	Brazileña	0.68	0.31	Voetsch et al., 2002
	Caribeña	0.77	0.48	Chen et al., 2003
	Caucásico- Americana	0.57	0.21	Chen et al., 2003
	Costarricense	0.25	0.24	Sen-Banerjee et al., 2000
	<b>Huicholes</b>	<b>0.96</b>	<b>0.59</b>	<b>Este trabajo</b>
	Indios Capayas de Ecuador	ND	0.78	Scachhi et al., 2003
	Mexicana	0.84	0.51	Rojas-Garcia et al., 2005
	Maya	0.95	0.43	Gamboa et al., 2006
	Mestiza	0.84	0.47	Gamboa et al., 2006
	México-americana	0.82	0.54	Holland et al., 2006
	Tenek	0.98	0.51	Gamboa et al., 2006
<b>Asia</b>	China	ND	0.59	Sanghera et al., 1997
	Japonesa	ND	0.60	Kuremoto et al., 2003
	Malaya	0.94	0.59	Poh y Muniandy, 2007
	Tailandesa	0.95	0.29	Phuntuwate et al., 2005
	<b>Europa</b>	Alemán	0.64	0.22
Británicos		0.64	0.26	Mackness et al., 2001
Española		0.59	0.30	Hernández et al., 2003
Finiandesa		0.65	ND	Salonen et al., 1999
Francesa		ND	0.29	Helbecque et al., 1999
Irlandés		0.64	0.31	Hasselwander et al., 1999
Italiana		0.63	0.26	Bonafé et al., 2002
Turca		0.72	0.31	Aynacioglu et al., 1999

ND= No determinado

## 7.7 Polimorfismo genético del CYP2D6\*4 en una población indígena huichol

Este estudio es la primera investigación enfocada en evaluar el polimorfismo del CYP2D6\*4 en una población indígena huichol. El alelo mutado (\*4/\*4) fue el menos frecuente en esta población (0.06). La presencia del alelo \*4 se asocia con una baja capacidad metabólica, los individuos que tienen baja actividad metabólica son llamados MP. La frecuencia del alelo \*4 es similar a la reportada en orientales (0.01) (Wang et al., 1993; Johansson et al., 1994), africanos y afro-americanos (0.07) (Leathart et al., 1998; Griese et al., 1999) (Tabla 11). Sin embargo, difiere de la reportada en polacos (0.23) (Niewinski et al., 2002) y rusos (0.18) (Gaikovitch et al., 2003), así como en una población de menonitas mexicanos (0.21) (Alanis-Bañuelos et al., 2007). Este alelo se llama inactivo y es el responsable del 70 al 90% de los MP en estas poblaciones. En algunas tribus indígenas genéticamente homogéneas como los cuna y ngawbe de Panamá, y los embera de Colombia, se presenta una frecuencia de MP de 0, 5.2 y 2.2% respectivamente (Arias et al., 1988a; Arias et al., 1988b; Jorge et al., 1999). Sosa-Macias et al. (2006) mencionan que en indígenas tepheuanos del estado de Durango no se identificó dicho fenotipo. Mientras que en mestizos la frecuencia fue de 6.8%, cercana a la obtenida en mestizos de la ciudad de México (10%) (López et al., 2005).

La frecuencia del alelo silvestre (0.94) observada en esta población fue similar a la reportada en otras poblaciones (Tabla 11). El genotipo más frecuente fue Sil/Sil (85.92%), seguido del Sil/\*4 (12.31%) y el menos frecuente fue el \*4/\*4 (0.77%). Esto es relevante porque los individuos que portan alelos polimórficos, que conducen a una alteración en la actividad enzimática de CYP2D6, tienen una disminución e incluso ausencia en la capacidad de biotransformación de plaguicidas tales como paratión, clorpirifos y diazinón, lo cual los puede hacer más susceptibles a los efectos adversos por exposición a estos compuestos (Sams et al., 2000). Cabe señalar que paratión, clorpirifos y diazinón fueron de los plaguicidas más ampliamente utilizados por la población de estudio.

**Tabla 11.** Frecuencia del polimorfismo genético CYP2D6\*4 en poblaciones humanas

	Población	Frecuencia alélica *4	Sil/Sil	Sil/*4	*4/*4	Referencia
<b>África</b>	Africanos	6.3	87.79	11.80	0.39	Griese et al., 1999
<b>América</b>	Colombianos	19.4	64.96	31.27	3.76	Isaza et al., 2000
	Huicholes	6	88	11	0.3	Este estudio
	Mexicanos	10.3	80.46	18.47	1.06	Mendoza et al., 2001
	Mexicanos	21	62	33.3	4.8	Alanis-Bañuelos et al., 2007
	Menonitas					
	Mexicanos	11.21	78.83	19.9	1.25	López et al., 2005
	Mestizos					
	Mexicanos	13.1	77.3	19.1	3.6	Sosa-Macias et al., 2006
	Mestizos					
	Mexicanos	5.5	89	11	0	Ortiz-Borrayo, 2010
	Nayaritas					
	Tepehuanos	0.6	98.7	1.1	0	Sosa-Macias et al., 2006
	Venezolanos	16.5	69	29	2	Grimán et al., 2009
<b>Asia</b>	Asiáticos	0.2	99.60	0.39	0.0004	Ji et al., 2002
	Hindú	7.3	85.93	13.53	0.5	Naveen et al., 2006
<b>Europa</b>	Alemania	20.7	62.88	32.83	4.28	Sachse et al., 1997

## 8. CONCLUSIONES

- 1) Los jornaleros expuestos a plaguicidas presentaron menor actividad BuChE en comparación con la población de referencia. El promedio de la actividad BuChE en ambas poblaciones fue menor a los valores considerados como normales para una población mexicana. Por otro lado, la actividad AChE de los jornaleros expuestos a plaguicidas no fue diferente a la del grupo control, sin embargo, el 50% de mujeres y el 60% de hombres presentaron valores por debajo de los reportados como normales en una población mexicana.
- 2) La prevalencia de anemia en la población de estudio fue de 42% y el 82% tuvo valores de eritrocitos por debajo de los mínimos normales. Los jornaleros expuestos a plaguicidas tuvieron niveles más bajos de leucocitos pero mayores niveles de linfocitos, con respecto al grupo de referencia.
- 3) La población expuesta a plaguicidas presentó menor actividad ARE y una tendencia a tener menor actividad CMPasa que el grupo de referencia. Se observó una correlación entre la actividad BuChE con la actividad ARE y la actividad AChE con la actividad CMPasa.
- 4) Se observó una alta frecuencia de los alelos PON1 55L y PON1 192R, los cuales se asocian con alta capacidad de detoxificación de POF. En este estudio el fenotipo de PON1 estuvo modulado por la exposición a plaguicidas y por la presencia de polimorfismos genéticos en el gen de PON1.
- 5) La frecuencia alélica del CYP2D6\*4 observada en esta población de estudio fue de 0.06, la presencia de este alelo se relaciona con una pobre o nula capacidad de biotransformación de xenobióticos por parte de este citocromo.
- 6) Se requiere de más estudios en los que se evalúen biomarcadores toxicológicos en diferentes escenarios de exposición a plaguicidas, lo anterior para tener un panorama más completo que contribuya en la evaluación del riesgo toxicológico en poblaciones indígenas.



## 9. PERSPECTIVAS

Es importante realizar estudios en los que se evalúe periódicamente a los jornaleros agrícolas indígenas, locales y migrantes, mediante una batería de biomarcadores toxicológicos de plaguicidas en las etapas de menor y mayor exposición.

Aumentar el tamaño de la muestra y evaluar polimorfismos presentes en otras enzimas que participan en la biotransformación de plaguicidas, específicamente GSTM1, GSTT1, CYP2B6, CYP2C19 y CYP3A4 .

Evaluar la presencia de polimorfismos en las colinesterasas que pudieran explicar los valores en la actividad de estas enzimas.

Capacitar constantemente a los jornaleros en el uso y aplicación de los plaguicidas, así como darles a conocer los efectos tóxicos de los mismos y como pueden prevenirlos. También es importante la difusión de la información y la educación ambiental para las comunidades indígenas.

## 10. REFERENCIAS

- Adkins S, Gan KN, Mody M, La Du BN. (1993). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet*; 53:598-608.
- Alanis-Bañuelos RE, Ismael-Lares A, Sosa-Macias M, Bradley-Álvarez F, Lazaide Ramos B. (2007). Polimorfismo del CYP2D6 en menonitas mexicanos de origen caucásico del estado de Durango, México. *Investigación en Salud*; IX(2):100-103.
- Alavanja MC, Dosemeci M, Samanic C, Lubin J, Lynch CF, Knott C, Barker J, Hoppin JA, Sandler DP, Coble J, Thomas K, Blair A. (2004). Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am J Epidemiol*; 160(9):876-885.
- Albert L. (2005). Panorama de los plaguicidas en México. Séptimo Congreso de Actualización en Toxicología Clínica. Tepic, Nayarit 1 y 2 de septiembre, 2005. 17 p.
- Albiano NF, Matos E, Uizich R, Buján EC, Loria D, Sobel N, Dolut F. (1986). Efectos sobre la salud por uso prolongado de plaguicidas. Estudio clínico-bioquímico. *Acta Bioq clin Latinoam*; XX(1):65-72.
- Allebrandt KV, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. (2002). Variability of the paraoxonase gene (PON1) in Euro- and Afro-Brazilians. *Toxicol Appl Pharmacol*; 180(3):151-156.
- Al-Sarar AS, Abo-Bakr Y, Al-Erimah GS, Hussein HI, Bayoumi AE. (2009). Hematological and biochemical alterations in occupationally pesticides-exposed workers of Riyadh municipality, Kingdom of Saudi Arabia. *Res J Environ Toxicol*;3:179-185.
- Aportela-Gilling P, Batista Duharte A, Betancourt JE, Font-Lores O, Colón M, Urdaneta-Laffita I. (2001). Efecto de dosis única de Baytex sobre el sistema inmune en ratones B6DF1. *Anu Toxicol* 2001; 1(1):78-84.

- Araoud M, Neffeti F, Douki W, Najjar MF, and Keani A. (2010). Paraoxonase 1 Correlates with Butyrylcholinesterase and Gamma Glutamyl Transferase in Workers Chronically Exposed to Pesticides. *J Occup Health*; 52: 383-388.
- Araoud M, Neffeti F, Douki W, Ben-Hfaiedh H, Akrouf M, Najjar MF, Kenani A. (2011). Factors Influencing Plasma Butyrylcholinesterase Activity in Agricultural Workers. *Ann Biol Clin*; 69:159-166.
- Arias TD, Jorge LF, Lee D, Barrantes R, Inaba T. (1988a). The oxidative metabolism of sparteine in the Cuna Amerindians of Panama: absence of evidence for deficient metabolizers. *Clin Pharmacol Ther*; 43:456-465.
- Arias TD, Inaba T, Cooke RG, Jorge LF. (1988b) A preliminary note on the transient polymorphic oxidation of sparteine in the Ngawbe Guaymi Amerindians: a case of genetic divergence with tentative phylogenetic time frame for the pathway. *Clin Pharmacol Ther*; 44:343-351.
- Aviram M, Rosenblat M. (2005). Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol*; 16:393-399
- Aynacioglu AS, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Nacak M, Tapanyigit E, Roots I. (1999). Paraoxonase I mutation in a Turkish populations. *Toxicol Appl Pharmacol*; 157: 174-177.
- Barr DB, Needham LL. (2002). Analytical Methods for Biological Monitoring of Exposure to Pesticides. *J Chromatogr B*; 778:5-29.
- Benford DJ, Hanley BA, Bottrill K, Oehlschlager S, Balls M, Branca F, Castengnaro JJ, Descotes J, Hemminiki K, Lindsay D, Schitter B. (2000) Biomarkers as predictive tools in toxicity testing. *Altern Lab Anim*; 28:119-131.
- Bonafè M, Marchegiani F, Cardelli M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, Pieri C, Marra M, Antonicelli R, Troiano L, Guerresi P, Passeri G, Berardelli M, Paolisso G, Barbieri M, Tesei S, Lisa R, De Benedictis G, Franceschi C. (2002). Genetic analysis of Paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg192 allele in centenarians. *Eur J Hum Genet*; 10(5):292-6.
- Bouwman H, Sereda B, Meinhardt HM. (2006). Simultaneous Presence of DDT and Pyrethroid Residues in Human Breast Milk From a Malaria Endemic Area in South Africa. *Environ pollut*; 144:902-917.

- Blatter-Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche M, Passa P, Froguel P, Ruiz J. (1997). Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest*; 99:62-66.
- Brophy VH, Jarvik GP, Richter RJ, Rozek LS, Schellenberg GD, Furlong CE. (2000). Analysis of paraoxonase (PON1) L55M status requires both genotype and phenotype. *Pharmacogenetics*; 10: 453-460.
- Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, Mckinstry LA, Furlong CE. (2001). Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet*; 68:1428-1436.
- Carreño J, Rivas A, Granada A, López-Espinosa M, Mariscal M, Olea N, Olea-Serrano F. (2006). Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environ Res*; 103:55-61.
- Cataño H, Cueva JL, Cárdenas AM, Izaguirre V, Zavaleta A, Carranza E, Hernández AF. (2006). Distribution of paraoxonase-1 gene polymorphisms and enzyme activity in a Peruvian population. *Environ Mol Mutagen*; 47:699-706.
- Cataño HC, Carranza E, Huamani C, Hernández AF. (2008). Plasma cholinesterase levels and health symptoms in Peruvian farm workers exposed to organophosphate pesticides. *Arch Environ Contam Toxicol*; 55(1): 153-159.
- CDI (2010). Comisión Nacional Para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas. Pueblos indígenas del México contemporáneo. Disponible en: <http://www.cdi.gob.mx/>
- Chen J, Kumar M, Chan W, Berkowitz G, Wetmur JG. (2003). Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. *Environ Health Perspect* 2003; 111:1403-1409.
- Cole TB, Walter J, Shih DM, Tward AD, Lusia AJ, Timchalk C, Richter JR, Costa LG, Furlong CE. (2005). Toxicity of chlorpyrifos oxon in a transgenic mouse model of the human paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism. *Pharmacogenet Genom*; 2005; 15:589-98.

- Costa LG, Richter RJ, Li WF, Cole T, Guizzetti M, Furlong CE. (2003). Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomarkers*; 8:1-12.
- Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Fulong CE. (2005). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol*; 69:541-550.
- Da Silva J, Moraes CR, Heuser VD, Andrade VM, Silva FR, Kvitko K, Emmel V, Rohr P, Bordin DL, Andreazza AC, Salvador M, Henriques JA, Erdtmann B. (2008). Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis*; 23(5):415-422.
- Damgaard IN, Skakkebaek NE, Toppari J, Virtanen HE, Shen H, Schramm KW, Petersen JH, Jensen TK, Main KM. (2006). Nordic Cryptorchidism Study Group. Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environ Health Perspect*; 114(7):1133-8.
- DGE. (2013). Dirección general de epidemiología. Boletín epidemiológico. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx>. [Consultado en mayo de 2013]
- Davington L, Pierre ST, Charest G, Tourangeau F. (1965). Study of the chronic effects of insecticides in man. *J Can Med Assoc*; 92:597-602.
- Donato MT. (2004). ¿Qué es el citocromo P-450, y cómo funciona?. *An R Acad Nac Farm*; P 32-43.
- Draganov DI, La Du BN. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Nauny-Schmiedeberg Arch Pharmacol*; 369:78-88.
- Eckerson HW, White CM, La Du BN. (1983). The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*; 35:1126-1138.
- Eddleston M, Eyer P, Worek F, Rezvi-Sheriff MH, Buckley NA. (2008). Predicting outcome using butyrylcholinesterase activity in organophosphorus pesticide self-poisoning. *Q J Med*; 101:467-474.
- Espiritu P. (2008). Los polimorfismos genéticos del citocromo P450 y su relevancia en el metabolismo de xenobióticos. *Infármate*. Artículos de revisión bibliográfica 4:21-22. Disponible en:



<http://www.infarmate.org/pdfs/infarmate21/metabolismo.pdf> [Consultado en Enero 2012]

- FAO. (2003). Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Roma. P 40.
- Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Motulsky AG. (1988). Role of Genetic Polymorphism of Human Plasma Paraoxonase/Arylesterase in Hydrolysis of the Insecticide Metabolites Chlorpyrifos Oxon and Paraoxon. *Am J Hum Genet*; 43(3):230-8.
- Furlong CE, Cole TB, Jarvik GP, Costa LG. (2002). Pharmacogenomic considerations of the paraoxonase polymorphisms. *Pharmacogenomics*; 3:1-8.
- Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I. (2003). Polymorphisms of drug metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol*; 59(4):303-312.
- Gamboa R, Zamora J, Rodríguez-Pérez JM, Fragoso JM, Cardoso G, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G. (2006). Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican populations. Its role in the lipid profile. *Exp Mol Pathol*; 80:85-90.
- Gamlin J, Diaz Romo P, Hesketh T. (2007). Exposure of young children working on Mexican tobacco plantations to organophosphorous and carbamic pesticides, indicated by cholinesterase depression. *Child care health dev*; 33(3):246-248.
- Gardemann A, Philipp M, Hess K, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. (2000). The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis*; 152:421-431.
- González-Arias CA, Robledo-Marengo ML, Medina-Díaz IM, Velázquez-Fernández JB, Girón- Pérez MI, Quintanilla- Vega B, Ostrosky- Wegman P, Pérez-Herrera NE, Rojas-García AE. (2010). Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. *Rev Int Contam Ambie*; 26(3):221-228.

- González-Farías F. (2003). Pesticides in the coastal zone of Mexico. In: Taylor MD, Klaine SJ, Carvalho FP, Barcelo D, Everaarts J. (Eds.), *Pesticide Residues in Coastal Tropical Ecosystems; Distribution, Fate and Effects*. Taylor & Francis, New York, pp. 311–337.
- Griese UE, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. (1999). Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics*; 9:715-723.
- Grimán P, Morán Y, Camargo M, Chiurillo M. (2009). Caracterización de variantes alélicas de Citocromo CYP2D6 en la población de la región centrooccidental de Venezuela. *Act Biol Colomb*; 14(1):195-202.
- Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*; 11(5):412-9.
- Harley KG, Huen K, Aguilar-Schall R, Holland NT, Bradman A, Barr DB, Eskenazi B. (2011). Association of Organophosphate Pesticide Exposure and Paraoxonase with Birth Outcome in Mexican-American Women. *PLoS ONE*; 6(8): e23923.
- Hashmi I, Khan AD. (2011). Adverse Health Effects of Pesticide Exposure in Agricultural and Industrial Workers of Developing Country. En: *Pesticides - The Impacts of Pesticide Exposure*, (Ed: Margarita Stoytcheva) InTech, 155-178.
- Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, Loughrey CM, McNamee PT, Middleton D, Nicholls DP, Maxwell AP, Young IS. (1999). Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Kidney Int*; 56:289-98.
- He F. (1999). Biological Monitoring of Exposure to Pesticides: Current Issues. *Toxicol Lett*; 108:277-283.
- Helbecque N, Cottel D, Meirhaeghe A, Dallongeville J, Amouyel P. (1999). Paraoxonase (Gln192-Arg) polymorphism in French type 2 diabetics. *Atherosclerosis*; 147(2):415-6.

- Heredia E. (2003). Productores de tabaco en Nayarit: uso de plaguicidas y mano de obra indígena, Universidad Autónoma de Nayarit (Cuadernos de Investigación 8), Nayarit, México.
- Hernández AF, Mackness B, Rodrigo L, López O, Pla A, Gil F, Durrington PN, Pena G, Parron T, Serrano JL, Mackness MI. (2003). Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum Exp Toxicol*; 22:565-574
- Hernández AF, Gómez MA, Pena G, Gil F, Rodrigo L, Villanueva E, Pla A. (2004). Effect of longterm exposure to pesticides on plasma esterases from plastic greenhouse workers. *J Toxicol Environ Health A*; 67:1095-1108.
- Hernández AF, López O, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL, Parrón T, Álvarez JC, Lorente JA, Pla A. (2005). Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol lett*; 159:13-21.
- Hernández AF, Gómez MA, Pérez V, García-Lario JV, Pena G, Gil F, López O, Rodrigo L, Pino G, Pla A. (2006). Influence of Exposure to Pesticides on Serum Components and Enzyme Activities of Cytotoxicity Among Intensive Agriculture Farmers. *Environ Res*; 102:70-76.
- Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, Da Silva J. (2007). Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. *Toxicology*; 232(3):235-47.
- Hill RH, Head SL, Baker S, Gregg M, Shealy DB, Bailey DB, Williams CC, Sampson EJ, Needham LL. (1995). Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations. *Environ Res*; 71:99-108.
- Holland N, Furlong C, Bastaki M, Richter R, Bradman A, Huen K, Beckman K, Eskenazi B. (2006). Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns. *Environ Health Perspect*; 114:985-991.
- Holmstedt B. (1959). Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Rev*; 11:567-688.



- Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle PM, Bergman HL. (1992). Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Strees. A special publication of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Humbert R, Adler DA, Distechte CM, Hasset C, Omiecinski CJ, Furlong CE. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*; 3:73-76.
- INAFED (2010): Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal. Estado de Nayarit. Disponible en: [http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM\\_nayarit](http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_nayarit) [Consultado en Febrero de 2010]
- INEGI (1998). Informe 1997. Estadística del medio ambiente. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.
- INEGI (2005). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx) [Consultado en Febrero de 2010]
- INEGI (2010). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx) [Consultado en Febrero de 2010]
- INEGI (2012). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Disponible en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx) [Consultado en Marzo de 2013]
- Isaza CA, Henao J, López AM, Cacabelos R. (2000). Isolation, sequence and genotyping of the drug metabolizer CYP2D6 gene in the Colombian population. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 22(9):695-705.
- Jaga K, Dharmani C. (2003). Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Publica*; 14:171-185.
- Jeyaratnam J, Maroni M. (1994) Organophosphorous compounds. *Toxicology*; 99(91):15-27.
- Ji L, Pan S, Marti-Jaun J, Hänseler E, Rentsch K, Hersberger M. (2002). Single step Assay to Analyze CYP2D6 Gene Polymorphism in Asian: allele frequency and a novel \*14b allele in Mainland Chinese. *Clin Chem*; 48(7):938-988.
- Jintana S, Sming K, Krongtong Y, Thanyachai S. (2009). Cholinesterase Activity, Pesticide Exposure and Health Impact in a Population Exposed to **Organophosphates**. *Int Arch Occ Env Hea*; 82:833-842.

- Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. (1994). Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502D locus: characterization of variant CYP2D6 genes in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*; 46:452-459.
- Jorge LF, Eichelbaum M, Griese EU, Inaba T, Arias TD. (1999). Comparative evolutionary pharmacogenetics of CYP2D6 in Ngawbe and Embera Amerindians of Panama and Colombia: role of selection versus drift in world populations. *Pharmacogenetics*; 9:217-228.
- Kamel F, Hoppin JA. (2004). Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environmental Health Perspectives*; 112:950-958.
- Kanamori-Kataoka M, Seto Y. (2009). Paraoxonase activity against nerve gases measured by capillar electrophoresis and characterization of human serum paraoxonase (PON1) polymorphism in the coding region (Q192R). *Anal Biochem*; 385:94-100.
- Kelce WR, Gray LE, Wilson EM. (1998). Antiandrogens as environmental endocrine disruptors. *Reprod Fertil Dev*; 10(1):105-11.
- Kurose K, Sugiyama E, Saito Y. (2012). Population Differences in Major Functional Polymorphisms of Pharmacokinetics/pharmacodynamics-related Genes in Eastern Asians and Europeans: Implications in the Clinical Trials for Novel Drug Development. *Drug Metab Pharmacokinet*; 27 (1): 954
- Klug SW y Cummings RM. (2000). *Concepts of Genetics*. 6a. Ed. Prentice Hall, Inc. 816 pp.
- Kuremoto K, Watanabe Y, Ohmura H, Shimada K, Mokuno H, Daida H. (2003). R/R genotype of human paraoxonase (PON1) is more protective against lipoprotein oxidation and coronary artery disease in Japanese subjects. *J Atheroscler Thromb*;10(2):85-92.
- La Du BN. (1992). Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W, Ed. *Pharmacogenetics of Drug Metabolism*. New York: Pergamon Press.
- Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK. (1998). CYP2D6 phenotype-genotype relationship in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics*; 8:529-541.

- Leviev I, James RW. (2000). Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20:516–521.
- Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lusis AJ, Furlong CE. (2000). Catalytic efficiency determines the in-vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphorus compounds. *Pharmacogenetics*; 10:767-779.
- Liu YJ, Huang PL, Chang YF, Chen YH, Chiou YH, Xu ZL, Wong RH. (2006). GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 15:659-66.
- López M, Guerrero J, Jung-Cook H, Alonso ME. (2005). CYP2D6 genotype and phenotype determination in a Mexican Mestizo population. *Eur J Clin Pharmacol*; 61:749-754.
- López-Flores I, Lacasaña M, Blanco-Muñoz J, Aguilar-Garduño C, Sánchez-Villegas P, Pérez-Méndez OA, Gamboa-Ávila R. (2009). Relationship between human paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Lett*; 188:84–90.
- Lucas D, Ferrara R, Gonzales E, Albore, A, Manno M and Berthou F. (2001). Cytochrome CYP2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Toxicol Lett* 2001; 124: 71-81.
- Mackinlay H. (2008). Jornaleros agrícolas y agroquímicos en la producción de tabaco en Nayarit. *Alteridades*; 18(36):123-143.
- Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. (1998). Review: Human Serum Paraoxonase. *Gen Pharmacol*; 31:329-336.
- Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. (2001). Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21(9):1451-1457.
- Mansour SA. (2004) Pesticide exposure--Egyptian scene. *Toxicology*; 198(1-3):91-115.

- Maroni M, Colosio C, Feroli A, Fait A. (2000). Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. *Introduction. Toxicology*; 143(1):1-118.
- Martinez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Rev Int Cont Ambient*; 23:185-200.
- Mendoza R, Wan YJ, Poland RE, Smith M, Zheng Y, Berman N, Lin KM. (2001). CYP2D6 polymorphism in a Mexican American population. *Clin Pharmacol Ther*; 70(6):552-60.
- Naveen AT, Adithan C, Soya SS, Gerard N, Krishnamoorthy R. (2006). CYP2D6 genetic polymorphism in South Indian populations. *Biol Pharm Bull*; 29(8):1655-1658.
- Nebert DW, Russell DW. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*; 360(9340):1155-62.
- Neurath J. (2003). Huicholes. *Pueblos indígenas del México contemporáneo*. PNUD, México, 1ra Ed 34 pp.
- Ng V, Koh D, Wee A, Chia SE. (2009). Salivary Acetylcholinesterase as a Biomarker for Organophosphate Exposure. *Occup Med*; 59:120-122.
- Nicole Y, Lockridge O, Masson P, Fontecilla-Camps JC, Nachon F. (2003). Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products. *J Biol Chem*; 278(42):41141-41147.
- Niewinski P, Orzechowska-Juzwenko K, Hurkacz M, Rzemislawska Z, Jazwinska-Tarnawska E, Milejski P, Forkasiewicz Z. (2002). CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in a Polish population. *Eur J Clin Pharmacol*; 58(8):533-5.
- O'Malley M. (1997). Clinical evaluation of pesticide exposure and poisonings. *Lancet*; 349:1161-1166.
- OMS. (1990). Organización Mundial de la Salud. Plaguicidas. Informe Técnico No. 12. Organización Mundial de la Salud. Ginebra
- OMS. (1993). Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. Plaguicidas y salud en las Américas, Washington: OMS/OPS.

- OMS (2004). Organización Mundial de la Salud. (2004). La OMS recomienda la clasificación de los plaguicidas según sus riesgos y las directrices para la clasificación 2000-2002. Programa Internacional sobre Seguridad Química, Programa interorganismos para la gestión racional de los productos químicos, Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 60 p.
- Ortiz-Borraro LY. (2010). Determinación de la actividad acetilcolinesterasa y del polimorfismo genético CYP2D6\*4 en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas. Tepic, Nayarit, 45pp.
- Parrón T, Hernández AF, Pla A, Villanueva E. (1996). Clinical and biochemical changes in greenhouse sprayers chronically exposed to pesticides. *Hum Exp Toxicol*; 15:957-963
- Pastor S, Lucero S, Gutiérrez R, Durbán C, Parrón. (2002). Follow-up study on micronucleus frequency in Spanish agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis*; 17: 79-82.
- Peña CE, Carter DE, Ayala-Fierro F. (2001). Toxicología Ambiental: Evaluación de riesgos y restauración ambiental. Disponible en: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>. [Consultado en Mayo de 2011].
- Perea E. (2006). Plaguicidas, la peste de la ignorancia. *Teorema Ambiental*. Editorial 3w, México. Disponible en: [http://teorema.com.mx/secciones.php?id\\_sec=0](http://teorema.com.mx/secciones.php?id_sec=0). [Consultado en Septiembre de 2012]
- Phuntuwate W, Suthisang C, Koanantakul B, Mackness MI, Mackness B. (2005). Paraoxonase 1 status in the Thai population. *J Hum Genet*, 50(6): 293-300.
- Podolak M, Panasiuk L. (1997). Biological indicators for the assessment of human exposure to organophosphorus compounds. *Przegl Lek*, 54:719-722.
- Poh R, Muniandy S. (2007). Ethnic variations in paraoxonase1 polymorphism in the Malaysian population. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*; 38(2):392-7.
- Quintanilla-Vega B, Pérez-Herrera N, Rojas-García AE. (2012). The Role of Human Paraoxonase-1 (Pon1) as a Modulator of Organophosphorous Pesticide

- Adverse Effects. En: The impact of pesticides (Ed: Jokanovic M) AcademyPublish.org (Publishing Services LLC) USA. P 63-77.
- Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, VandeBerg JL. (2009). Determinants of variation in human serum paraoxonase activity. *Heredity*; 102: 147-154.
- Ramirez JA, Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*; 4(2):67-75.
- Ranjbar A, Pasalar P, Abdollahi M. (2002). Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Hum Exp Toxicol*; 21:179-82.
- Rastogi SK, Singh VK, Kesavachandram C, Yoti J, Siddiqui MKJ, Mathur N, Bharti RS. (2008). Monitoring of Plasma Butyrylcholinesterase Activity and Haematological Parameters in Pesticides Sprayers. *Indian J Occup Environ Med*; 12:29-32.
- Recio R, Ocampo-Gómez G, Moran-Martínez J, Borja-Aburto V, López-Cervante M, Uribe M, Torres-Sánchez L, Cebrían ME. (2005). Pesticide exposure alters follicle-stimulating hormone levels in Mexican agricultural workers.1: *Environ Health Perspect*; 113(9):1160-3.
- Reigart JR, Roberts JR. (1999). Recognition and management of pesticide poisonings. Fifth edition. EPA/735/R-98/003. Disponible en: <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/healthcare/handbook/handbook.htm>
- Remor AP, Totti CC, Moreira DA, Dutra GP, Heuser VD, Boeira JM. (2003). Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int*; 35:273-278.
- Remor AP, Totti CC, Moreira DA, Dutra GP, Heuser VD, Boeira JM. (2009). Occupational exposure of farm workers to pesticides: biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int*; 35:273-278.
- Rendón-von Osten JR; Tinoco-Ojanguren AMVM, Soares, Guilhermino L. (2004). Effect of pesticide exposure on acetylcholinesterase activity in subsistence farmers from Campeche, México. *Arch Environ Occup Health*; 59(8):428-435.

- Restrepo M, Muñoz N, Day NE, Parra JE, De Romero L, Nguyen-Dinh X. (1990). Prevalence of adverse reproductive outcomes in a population occupationally exposed in Colombia. *Scand J Work Environ Health*; 16:232-8.
- Richter RJ, Furlong CE. (1999). Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics*; 9:745-753.
- Richter RJ, Jarkiv GP, Furlong CE. (2008). Determination of Paraoxonase 1 Status Without the Use of Toxic Organophosphate Substrates. *Circ Cardiovasc Genet Dec*; 1(2):147-52.
- Richter RJ, Jarvik G P, Furlong CE. (2009) Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol Appl Pharmacol*; 235:1-9.
- Rojas-García AE, Solís-Heredia MJ, Piña-Guzmán B, Vega L, López-Carrillo L, Quintanilla-Vega B. (2005). Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol Appl Pharmacol*; 205:282-289.
- Rojas-García AE, Velázquez-Fernández JB. (2010). Human Paraoxonase (PON1). En: *Xenobiotics Metabolizing Enzymes and Xenobiotics Receptors. Pharmacological and Toxicological Aspects*, (Ed: Guillermo Elizondo Azuela) Transworld Research Network, 67-93.
- Rojas-García A, Medina-Díaz I, Robledo-Moreno M, Barrón-Vivanco B, Girón-Pérez M, Velázquez-Fernández J, González-Arias C, Albores-Medina A, Quintanilla-Vega B, Ostrosky-Wegman P, Rojas-García M, Pérez-Herrera N, López-Flores J. (2011). Hematological, biochemical effects and self-reported symptoms in pesticide retailers. *J Occup Environ Med*; 53:517-521.
- Safi JM, Abu-Mourad TA, Yassin MM. (2005). Hematological Biomarkers in Farm Workers Exposed to Organophosphorus Pesticides in the Gaza Strip. *Arch Environ Occup Health*; 60:235-241.
- SAGARPA. (2008). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Anuario estadístico de la producción agrícola. Cierre de la producción agrícola por estado. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Disponible en: [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351)

- Sachse C, Brockmüller J, Bauer S, Roots I. (1997). Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*; 60(2):284-95.
- Salonen JT, Malin R, Tuornainen TP, Nyyssonen K, Lakka TA, Lehtimäki T. (1999). Polymorphism in high density lipoprotein paraoxonase gene and risk of acute myocardial infarction in men: prospective nested case-control study. *Br Med J*; 319:487-489.
- Sams C, Mason HJ, Rawbone R (2000). Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicology Letters*; 116(3):217-221.
- Samuels A, Milby TH. (1971). Human exposure to lindans. Clinical, hematological and biochemical effects. *J Occup Med*; 13:147-151.
- Sanghera DK, Sahan N, Aston CE, Kamboh MI. (1997). Genetic polymorphisms of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17:1067-1073.
- Santiago C, Bandrés F, Gómez-Gallego F. (2002). Polimorfismos de citocromo P450: Papel como marcador biológico. *Medicina del Trabajo*; 11(3):130-140.
- Sarabia-Núñez C, Negrón BL, Meléndez SMC, Pérez GRM. (1998). Estudio bioquímico-clínico en personas ocupacionalmente expuesta a la acción de agroquímicos y efectos de uso frecuente sobre la salud. *Ciencia e Investigación*. Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01\\_n1/indexc.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01_n1/indexc.htm), 1998, [Consultado en september 2012]
- Scacchi R, Gambina G, Martini MC, Broglio E, Vilardo T, Corbo RM. (2003). Different pattern of association of paraoxonase Gln192-->Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease. *Neurosci Lett*; 339:17-20.
- Schaeffeler E, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger U. (2003). CYP2D6 Genotyping Strategy Based on Gene Copy Number Determination by TaqMan Real-Time PCR. *Hum Mutat*; 22(6):476-485.



- Sen-Banerjee S, Siles X, Campos H. (2000). Tobacco smoking modifies association between Gln-Arg192 polymorphism of human paraoxonase gene and risk of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20(9): 2120-6.
- Sepahvand F, Rahimi-Moghaddam P, Shafiei M, Ghaffari SM, Rostam-Shirazi M, Mahmoudian M. (2007). Frequency of paraoxonase 192/55 polymorphism in an Iranian population. *J Toxicol Environ Health Part A*; 70:1125-1129.
- Simoniello MF, Kleinsorge EC, Scagnetti JA, Mastandrea C, Grigolato RA Paonessa AM, Carballo MA. (2010). Biomarkers of Cellular Reaction to Pesticide Exposure in a Rural Population. *Biomarkers*; 15:52-60.
- Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL, Rai A. (2011). Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol*; 252:130-137.
- Soltaninejad K, Shadnia S, Afkhami-Taghipour M, Saljooghi R, Mohammadirad A, Abdollahi M. (2007). Blood  $\beta$ -glucuronidase as a Suitable Biomarker at Acute Exposure of Severe Organophosphorus Poisoning in Human. *Human and Experimental Toxicology*; 26:963-966.
- Sosa-Macias M, Elizondo G, Flores-Perez C, Flores-Pérez J, Bradle, Álvarez F, Alanis-Bañuelos RE, Lares-Asseff I. (2006). CYP2D6 genotype and phenotype in Amerindians of Tepehuano origin and Mestizos of Durango, México. *J Clin Pharmacol*; 46:527-36.
- Sosa-Macias M, Lares Asseff I. (2010). CYP2D6 polymorphism and its clinical implications. In *Xenobiotic Metabolizing Enzymes and Xenobiotic Receptors. Pharmacological and Toxicological Aspects*, (Editor: Guillermo Elizondo Azuela ) Transworld Research Network; 2010:1-20.
- Souza MS, Magnarelli GG, Rovedatti MG, Cruz SS, De D'Angelo, AM. (2005). Prenatal Exposure to Pesticides: Analysis of Human Placental Acetylcholinesterase, Glutathione S-Transferase and Catalase as Biomarkers of Effect. *Biomarkers*; 10:376-89.

- SSN. (2006-2011). Boletín toxicológico. Secretaría de Salud de Nayarit, Departamento de Control Estadístico. Disponible en: [www.ssn.gob.mx](http://www.ssn.gob.mx) [Consultado en agosto de 2012].
- Stefanidou M, Athanasis S, Spiliopoulou H. (2009) Butyrylcholinesterase: Biomarker for Exposure to Organophosphorus Insecticides. *Internal Medicine Journal*; 39:57-60.
- Suehiro T, Nakamura T, Inoue M, Shinoki T, Ikeda Y, Kumon Y, Shindo M, Tanaka H, Hashimoto K. (2000). A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis*; 150:295-298.
- Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. (2007). Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Arch Biochem Biophys*; 461(1):24-9.
- Ueyama J, Satoh T, Kondo T, Takagi K, Shibata E, Goto M, Kimata A, Saito I, Hasegawa T, Wakusawa S, Kamijima M. (2010).  $\beta$ -Glucuronidase Activity is a Sensitive Biomarker to Assess Low-level Organophosphorus Insecticide Exposure. *Toxicol Lett*; 193:115-119.
- Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. (2002). Paraoxonase 192 Gln $\rightarrow$ Arg Polymorphism : An Independent Risk Factor for Nonfatal Arterial Ischemic Stroke Among Young Adults. *Stroke*; 33:1459-1464.
- Wang SL, Huang JD, Lai MD, Liu BH, Lai ML. (1993). Molecular basis of genetic variation in debrisoquin hydroxylation in Chinese subjects: polymorphism in RFLP and DNA sequence of CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther*; 53:410-418.
- Wang X, Fan Z, Huang J, Su S, Yu Q, Zhao J, Hui R, Yao Z, Shen Y, Qiang B, Gu D. (2003). Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23(2):328-34.
- Wilson BW. (2001). Cholinesterases. In: *Handbook of pesticide toxicology* (Ed. Krieger RI). Vol. 2. Agents Academic Press, San Diego, USA. pp. 967-985.

- Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. (1999). Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin Chim Acta*; 288(1-2):73-90.
- Zanger U, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. (2008). Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450involved in drug biotransformation. *Anal Bio anal Chem*; 392(6):1093-1108.
- Zhou ZJ, Zheng J, Wu QE, Xie F. (2007). Carboxylic esterase and its associations with long-term effects of organophosphorus pesticides. *Biomed Environ Sci*; 20:284-90.