

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE



SISTEMA DE BIBLIOT

Evaluación del estrés oxidativo y daño genético en fumigadores
expuestos a plaguicidas en el estado de Nayarit

TESIS

Que para obtener el título de Maestro en Ciencias

PRESENTA

Rigoberto Daniel Zepeda Arce

DIRECTORA

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

CO-DIRECTORA

Dra. Yael Yvette Bernal Hernández

Xalisco Nayarit, noviembre de 2016

Tepic, Nayarit, a 24 de octubre de 2016

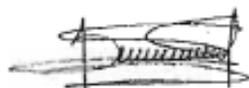
DR. J. DIEGO GARCÍA PAREDES
COORDINADOR DEL POSGRADO CBAP
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

PRESENTE

Los que suscribimos, integrantes del consejo tutorial del Q.F.B. **Rigoberto Daniel Zepeda Arce**, declaramos que hemos leído y revisado la tesis titulada "**Evaluación de estrés oxidativo y daño genético en fumigadores expuestos a plaguicidas en el estado de Nayarit**", y consideramos que ésta cubre los requisitos señalados en los lineamientos académicos del posgrado. Por lo que consideramos que el estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

ATENTAMENTE

EL CONSEJO TUTORIAL



Dra. Aurora Elizabeth Rojas Garcia
Directora



Dra. Yael Yvette Bernal Hernández
Codirectora



Dra. Irma Martha Medina Diaz
Asesor



Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco
Asesor



M. en C. María de Jesús Solís Heredia
Asesor



Dra. Maria Isabel Hernández Ochoa
Asesor



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/228/16.

Xalisco, Nayarit; 31 de octubre de 2016.

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

Con base al oficio de fecha 24 de octubre del presente, enviado por los CC. Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, Dra. Yael Yvette Bernal Hernández, Dra. Irma Martha Medina Díaz, Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco, M.C. María de Jesús Solís Heredia y Dra. María Isabel Hernández Ochoa, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza al **C. Rigoberto Daniel Zepeda Arce**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Ambientales.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Por lo Nuestro a lo Universal"

Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado

C.c.p.- Expediente

&mfm

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la dirección de la Dra. Aurora Elizabeth Rojas Garcia y la codirección de la Dra. Yael Yvette Bernal Hernández, con el financiamiento del fondo sectorial o CONACyT- SALUD-2014-1-233803.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres y a mi familia, a Sairely, a mis maestros y a mis amigos, que gracias a su apoyo, comprensión y motivación, he podido lograr lo que hasta el día de hoy he hecho.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Rosa del Carmen Arce Navarro y Rigoberto Zepeda Loera, porque siempre he contado con su apoyo, por ser mi ejemplo a seguir, por estar todo este tiempo al pendiente de mí y sobre todo, por poder ayudarme con todas mis dudas existenciales hasta el momento. Sé que contaré con su apoyo durante mucho tiempo más. No me alcanzaría la vida para agradecerles por todo lo que soy y lo que sé que llegaré a ser. LOS AMO INFINITAMENTE.

A Sairely, por tenerme el cariño, el amor y la paciencia durante todos estos años. Dos investigaciones, dos tesis realizadas, y seguir contando contigo, con tu apoyo y tu amor fue un gran impulso durante estos dos años de posgrado. Gracias por estar ahí en los momentos que más lo necesitaba. TE AMO.

Al posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias y Pesqueras, por haberme dado la oportunidad de estudiar en este posgrado, así como también por las atenciones que en su momento necesité.

A la Dra. Aurora. Usted maestra, que me tuvo de alumno en la carrera y aun así se arriesgó a tomarme como su alumno de maestría, le agradezco infinitamente por la paciencia que mostró conmigo durante estos dos años, el apoyo y todas las oportunidades que me brindó para poder ampliar mi conocimiento. Sé que no fue fácil, pero gracias por presentarme un mundo del cual dije que jamás iba a formar parte. Gracias por presentarme al mundo de la investigación.

A la Dra. Yael, por ser tan comprensiva y atenta, y sobre todo por ser tan buena persona conmigo. Por estar al pendiente y por ayudarme aquel día sábado maratónico. Sé que contaré con su apoyo y amistad durante mucho tiempo más. Gracias Yael.

A las Dras. Irma Martha y Briscia, por sus asesorías, consejos y por sus sugerencias y recomendaciones tanto en clases como en seminarios.

A todo el equipo que forma parte del laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental: Mayrita, Sandrita, Faby, Paty, Doña Rosita, Cyndia por apoyo y

facilidades que dieron durante estos dos años transcurridos. Muchas gracias por todo.

A la Dra. Betzabet Quintanilla y a Mary Solís del laboratorio 5, del departamento de toxicología del CINVESTAV Unidad Zacatenco en CDMX, por haberme recibido en dos estancias de investigación y poderme ayudar con parte experimental de esta investigación, y también un agradecimiento a las chicas que forman parte de este laboratorio: Nere, Lety, Pame y Yaz, las cuales me ayudaron en esas dos ocasiones. Muchas gracias por su ayuda chicas!

A Gustavo y Pier. Grandes personas y grandes estudiantes que desde hace tiempo han sido para mí grandes amigos. Gracias por todo el apoyo en el laboratorio, por ayudarme en los cálculos, en las alicuotas, y básicamente por ayudarme en todos los momentos dentro del laboratorio cuando más lo necesité. Sé que ahora tomamos rumbos un poco distintos por el momento, pero también sé que contaré con su amistad y apoyo en cualquier momento de la vida.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Alma, Paco, Carmelita, Néstor, Iris, Diana, Fátima, Gil, Emmanuell, Gustavo, Pier, Mirna, por todos los buenos momentos, la ayuda y los conocimientos que me compartieron y brindaron durante estos dos años (algunos durante más tiempo). Espero contar con su ayuda y apoyo durante más tiempo.

A la Red Temática de Toxicología de Plaguicidas por el apoyo brindado (CONACyT, Mexico: #233803, #253789).

A CONACyT por la beca otorgada durante los dos años del posgrado, además del proyecto de Salud del cual formó parte esta investigación.

A todas aquellas personas, amigos, familiares y demás, que de manera directa o indirectamente me apoyaron durante estos dos años, muchas gracias por estar al pendiente de mí.

"Lo que ahora somos es el resultado de lo que pensamos ayer, y nuestros pensamientos presentes construyen nuestra vida de mañana. Nuestra vida es la creación de nuestra mente."

Buda

RESUMEN

En la última década, se ha observado un aumento en el uso indiscriminado de plaguicidas, ya sea en la agricultura, o bien en campañas de salud para el control de vectores transmisores de enfermedades tales como el dengue. Debido a este problema, surge la necesidad de evaluar los efectos de la exposición a plaguicidas, particularmente en poblaciones ocupacionalmente expuestas como los fumigadores, ya que se ha asociado el aumento de estrés oxidativo con la exposición a este tipo de compuestos. A su vez, el estrés oxidativo se ha relacionado con problemas crónicos degenerativos y daño al material genético. Por otro lado, existen mecanismos de defensa antioxidante como las enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) que contrarrestan el estrés oxidativo, así también existen productos de lipoperoxidación como malondialdehído (MDA) que pueden utilizarse como biomarcadores para la medir el estrés oxidativo. En este estudio se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes, los marcadores de estrés oxidativo, así como el daño genético en fumigadores urbanos del estado de Nayarit. La población de estudio se estratificó de acuerdo a su grado de exposición (grupo de referencia, exposición moderada y exposición alta). La actividad de las enzimas antioxidantes y los niveles de MDA se midieron espectrofotométricamente. La genotoxicidad se evaluó a través del ensayo cometa. Los resultados de este estudio mostraron una disminución marginalmente significativa en las enzimas SOD y CAT en el grupo de exposición alta con respecto al grupo de referencia. En el caso de los niveles de MDA, se observaron niveles mayores en los trabajadores de base versus los trabajadores temporales. Además, en el grupo de exposición moderada, se observó una correlación positiva entre los niveles de MDA y la actividad de GPx, mientras que en el grupo de alta exposición se observó una correlación negativa entre la actividad GR y CAT así como, entre los niveles de MDA y la actividad GPx. En el grupo de alta exposición se observó una correlación positiva entre los parámetros de evaluación del daño genotóxico y los niveles de MDA. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una participación importante de las enzimas antioxidantes, en la protección del daño al ADN causado por la exposición ocupacional a plaguicidas.

ABSTRACT

During the last decade, there has been an increase in the indiscriminate use of pesticides, both in agriculture and in health campaigns, to control disease vectors such as dengue. Due to this problem, the need to assess the effects of exposure to pesticides, particularly in occupationally exposed populations such as urban fumigators arises, in that this has been associated with increased Oxidative Stress (OS) and has been linked with chronic degenerative problems and damage to genetic material. On the other hand, there are antioxidant defense mechanisms that counteract OS, such as the enzymes Super oxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx), and Glutathione reductase (GR), and there are also products of lipid peroxidation, such as Malondialdehyde (MDA), as biomarkers that can be used for measuring OS. The aim of this study was to determine the activity of antioxidant enzymes, OS markers, and genetic damage in urban pesticide sprayers from the Mexican state of Nayarit. The study population was stratified according to its degree of exposure (reference group, moderate exposure, and high exposure). Determination of MDA and antioxidant enzymes was performed spectrophotometrically. The genotoxic effect was evaluated through the Comet assay (Single Cell Gel Electrophoresis). The results showed a marginally significant decrease in SOD and CAT activities in the high-exposure group compared with the control group. In the case of MDA, a statistically significant difference was found between persons working permanently vs. temporarily as sprayers. On the other hand, in the moderate-exposure group, a positive correlation was observed between MDA levels and GPx activity, while in the high-exposure group, a negative correlation was observed between GR and CAT activities, as well as between MDA levels and GPx activity. Furthermore, in the high-exposure group, a positive correlation between DNA damage parameters and MDA levels was observed. The results obtained in this study suggest an important role for antioxidant enzymes in protection from DNA damage caused by occupational exposure to pesticides.

ÍNDICE

RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de los plaguicidas.....	1
1.2 Uso de plaguicidas en México.....	3
1.3 Efectos tóxicos de los plaguicidas.....	4
1.4 Estrés oxidativo y plaguicidas.....	5
1.4.1 Sistemas de defensa antioxidantes.....	9
1.5 Daño genético y plaguicidas.....	11
2 JUSTIFICACIÓN.....	13
3 HIPÓTESIS.....	14
4 OBJETIVO GENERAL.....	15
4.1 Objetivos específicos.....	15
5 METODOLOGÍA.....	16
5.1 Diseño de estudio.....	16
5.2 Toma de muestra.....	17
5.3 Determinaciones analíticas.....	17
5.3.1 Actividad acetilcolinesterasa.....	17
5.3.2 Actividad butirilcolinesterasa.....	19
5.3.3 Actividad superóxido dismutasa.....	20
5.3.4 Actividad catalasa.....	21

5.3.5	Actividad glutatión peroxidasa	22
5.3.6	Actividad glutatión reductasa	23
5.3.7	Niveles del malondialdehído	25
5.3.8	Determinación del daño genotóxico	26
5.4	Análisis estadístico	28
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1	Características generales de la población	29
6.2	Actividad de colinesterasas	31
6.3	Enzimas antioxidantes	36
6.4	Niveles de MDA	46
6.5	Daño genético evaluado a través del ensayo cometa	48
7	CONCLUSIONES	56
8	PERSPECTIVAS	57
9	BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.....	7
Tabla 2. Antecedentes de la relación estrés oxidativo-daño genético con la exposición a plaguicidas.....	12
Tabla 3. Ensayo enzimático de SOD.....	21
Tabla 4. Características generales de la población de estudio.....	32
Tabla 5. Plaguicidas más utilizados por la población de estudio.....	33
Tabla 6. Frecuencia de uso de equipo de protección.....	34
Tabla 7. Análisis de regresión logística modelando la actividad enzimática de catalasa.....	38
Tabla 8. Análisis de regresión logística modelando la actividad enzimática superóxido dismutasa.....	41
Tabla 9. Análisis de regresión logística modelando la actividad enzimática glutatión peroxidasa.....	43
Tabla 10. Análisis bivariado modelando la actividad enzimática glutatión reductasa en sangre total.....	45
Tabla 11. Análisis bivariado modelando la actividad enzimática glutatión reductasa en plasma.....	46
Tabla 12. Análisis de regresión logística modelando los niveles de malondialdehído.....	48
Tabla 13. Análisis bivariado modelando la longitud de la cola del cometa.....	50
Tabla 14. Análisis de regresión logística modelando el momento de la cola de cometa.....	50
Tabla 15. Análisis de regresión logística modelando el momento de la cola de Olive.....	51
Tabla 16. Análisis bivariado modelando el porcentaje de ADN.....	51
Tabla 17. Análisis multivariado modelando el porcentaje de ADN.....	51
Tabla 18. Análisis de correlación entre las actividades de enzimas antioxidantes, niveles de malondialdehído y parámetros de daño genético.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de un compuesto OF.....	1
Figura 2. Actividad AChE y BuChE en la población de estudio de acuerdo al grado de exposición.....	35
Figura 3. Actividad CAT y SOD en la población de estudio.....	37
Figura 4. Actividad GPx en la población de estudio.....	42
Figura 5. Actividad GR en sangre total y en plasma en la población de estudio.....	45
Figura 6. Niveles de MDA de acuerdo al grado de exposición a plaguicidas y tiempo trabajando.....	47
Figura 7. Longitud de la cola, momento de la cola, momento de la cola de Olive y porcentaje de ADN (%) en linfocitos de sangre periférica de la población de estudio.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

%ADN	Porcentaje de ADN
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADP	Adenosin-di-fosfato
BHT	Butilhidroxitolueno
BuChE	Butirilcolinesterasa
CAT	Catalasa
Cu-Zn SOD	Superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc
CYP 450	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfoxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDTA-Na ₂	Ácido etilendiaminotetraacético disódico
EtBr	Bromuro de etidio
ExSOD	Superóxido dismutasa extracelular
GABAA	Receptor ionotrópico del ácido gamma-aminobutírico
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
IMC	Índice de Masa Corporal
MDA	Malondialdehido
Mn SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Anión superóxido

.O ₂	Oxígeno singlete
O ₃	Ozono
OC	Organoclorados
OF	Organofosforados
·OH	Radical hidroxilo
ONOO·	Peroxinitrito
RL	Radicales libres
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROO·	Radical peroxil
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
WST	Tetrazolio soluble en agua
XO	Xantina oxidasa

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de los plaguicidas

De acuerdo con el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC), los plaguicidas son un grupo de sustancias químicas o mezclas de éstas, utilizadas para eliminar insectos, plantas o roedores (INECC, 2013). Los plaguicidas se pueden presentar bajo la forma de polvos, emulsiones y soluciones con diferentes disolventes, cuya acción tóxica, tanto aguda como crónica, también debe ser considerada (Jerez y Martínez, 2007).

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo a su uso: agrícolas, industrial, doméstico y en el sector salud para el control de vectores transmisores de enfermedades como el dengue. También, se pueden clasificar por el tipo de organismo que afectan: insecticidas, acaricidas, funguicidas, herbicidas, entre otros; por su modo de acción: de contacto, ingestión, fumigantes y sistémico y por su naturaleza química: organofosforados (OF), organoclorados (OC), carbamatos, piretroides, entre otros.

Organofosforados

Los plaguicidas OF, son ésteres derivados del ácido fosfórico o fosforotióico que actúan sobre el sistema nervioso central, inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Silveira et al., 2011). La fórmula general de estos compuestos, se caracteriza por la presencia de grupos éster (figura 1).

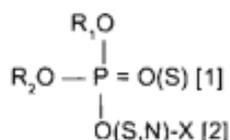


Figura 1. Estructura química de un compuesto OF.

En la que R_1 y R_2 corresponden a radicales alquilo, generalmente metilo o etilo, mientras que el grupo X es característico de cada especie química, frecuentemente

es un radical arilo, el cual suele contribuir de manera importante en sus propiedades físicas y químicas (Quinto, 1999). Este tipo de plaguicidas ha sido de los más utilizados a nivel mundial para la agricultura y para el control de vectores transmisores de enfermedades (Koureas et al., 2014).

Algunos de los biomarcadores clásicos para evaluar la exposición a plaguicidas OF, es la medición de la actividad acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE). La AChE o colinesterasa eritrocitaria es la enzima responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh) en colina y ácido acético en la sinapsis nerviosa y cuya inhibición es considerada el principal mecanismo de acción de los plaguicidas OF y carbamatos (Colovic et al., 2013). En cuanto a la enzima BuChE, no se conoce la función fisiológica, sin embargo, se sabe que provee protección contra los efectos adversos de OF, carbamatos y otros anticolinesterásicos actuando como agente secuestrador, uniéndose a ellos y de esta manera permite la recuperación de los niveles de AChE (Steele et al., 2015).

Organoclorados

Los plaguicidas OC, son compuestos orgánicos con estructura cíclica que presentan átomos de cloro en su molécula. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de los receptores GABAA y de glicina, así como, afectando las aperturas de los canales de sodio (Androutsopoulos et al., 2013). Estos se pueden dividir estructuralmente en 3 grupos: derivados del cloroetano, ciclodienos y derivados del clorociclohexano (Jerez y Martínez, 2007). La estructura presente en este tipo de compuestos les confiere alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos (Ramírez y Lacasaña, 2001). Estos compuestos se encuentran entre los plaguicidas de mayor tiempo de vida (Kaminski et al., 2008). Si bien, estos compuestos fueron los primeros insecticidas comercializados a nivel mundial, el uso de la mayoría de éstos ya no está autorizado por la persistencia que tienen en el ambiente (Karam et al., 2004).

Carbamatos

Los insecticidas carbamatos son ésteres derivados del ácido *N*-metil o dimetil carbámico (Costa, 2008). Al igual que los plaguicidas OF, su mecanismo de acción es a través de la inhibición de la enzima AChE con la diferencia de que ésta inhibición es de manera reversible (Karam et al., 2004), además de tener un efecto inmunotóxico al interferir con el metabolismo, las vías de señalización y la integridad celular (Dhouib et al., 2016). Estos plaguicidas son utilizados principalmente como insecticidas, fungicidas y herbicidas (Miranda-Contreras et al., 2013).

Piretroides

Los piretroides son compuestos sintéticos basados estructuralmente en las piretrinas (Jerez y Martínez, 2007). Su mecanismo de acción se basa en la modificación de la cinética de los canales de sodio, mediando la permeabilidad del sodio en la membrana nerviosa en la fase de recuperación del potencial de acción de las neuronas (Soderlund, 2010). De acuerdo a los síntomas de intoxicación que generan, los piretroides se pueden clasificar en dos grupos: los que producen el denominado síndrome tipo I (ésteres que carecen del sustituyente α -ciano como las permetrinas) el cual se caracteriza por hiperexcitabilidad y temblores en el cuerpo, y los que producen síndrome tipo II (ésteres que contienen el sustituyente α -ciano como las cipermetrinas), los cuales se caracterizan por salivación excesiva, movimientos involuntarios y convulsiones progresivas (Jerez y Martínez, 2007; Li et al., 2011; Saillenfait et al., 2015). Éstos son la mayor clase de insecticidas usados en la agricultura y en áreas urbanas debido a su alta potencia y selectividad, así como su baja persistencia comparada con otros plaguicidas (Li et al., 2011).

1.2 Uso de plaguicidas en México

El uso de plaguicidas es amplio a nivel mundial y brindan múltiples beneficios particularmente en el área agrícola. Sin embargo, es necesario establecer un punto de equilibrio entre los beneficios y riesgos derivados del uso de estos compuestos, de manera que sustenten las condiciones más idóneas posibles para promover la salud y protección al ambiente (INECC, 2013). Se estima que, en el 2005, el volumen

de plaguicidas formulados en el mundo alcanzó casi los seis millones de toneladas (Carvalho, 2006) y de no ocurrir cambios en el manejo de plagas, en 2020 se alcanzarán los 6.5 millones de toneladas de ingrediente activo (Tilman et al., 2002).

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), el promedio anual de consumo de plaguicidas en México en el 2009 fue de 36.3 mil toneladas, seguido de Japón, India y Turquía, con 23.4, 14.8, y 11.4 mil toneladas respectivamente (Ortiz et al., 2014). Mientras que en el año 2013, en México se utilizaron 37.455 toneladas de insecticida, 31.195 toneladas de herbicidas y 42.223 toneladas de fungicidas (FAO, 2016).

Por otra parte, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2013) reportó que en el periodo de 1995 a 2011 se registró un total de 2,518 defunciones por intoxicación con plaguicidas en todo el país, de los cuales el 58.6% correspondían al sexo masculino. Estos antecedentes denotan que, en México, el uso de plaguicidas tiene una fuerte concentración en algunas regiones. En este sentido, los estados que presentaron la tasa de mortalidad más alta fueron Chiapas, Nayarit, Colima, Guerrero y Oaxaca. Lo cual coincide con los estados donde se usan más plaguicidas, entre los que se encuentran: Campeche, Chiapas, Chihuahua, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz (SINAVE, 2013).

En Nayarit, los plaguicidas más utilizados son los insecticidas, principalmente OF (52%), seguido de piretroides (26.4%), carbamatos (13.2%) y OC con 8.4% (González-Arias et al., 2010). Dentro de los insecticidas OF se encuentran clorpirifos, metamidofos, paratión metílico y dimetoato, los cuales, se encuentran clasificados dentro del grupo Ia (extremadamente peligrosos) y Ib (altamente peligrosos) de acuerdo con la clasificación toxicológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (González-Arias et al., 2010).

1.3 Efectos tóxicos de los plaguicidas

Los efectos tóxicos de los plaguicidas en el ser humano dependen de diversos factores que pueden modular el grado de toxicidad. Estos factores pueden ser

externos como: el tipo de plaguicida, tiempo de exposición y concentración del mismo, entre otros. Dentro de los factores internos se encuentran: edad, género, nivel hormonal, alimentación, estilo de vida, estado de salud de la persona al momento del contacto con el plaguicida, entre otros (Rose y Hodgson, 2004).

Se consideran básicamente dos tipos de intoxicación derivadas de la exposición a plaguicidas: aguda y crónica. Los efectos agudos se presentan usualmente al cabo de unos minutos u horas después de la exposición y pueden ser locales o sistémicos (Karam et al., 2004), entre los que se incluyen: fatiga, mareos, náuseas y vómitos, hasta efectos respiratorios y neurológicos que pueden poner en peligro la vida (Maroni et al., 2000). En cuanto a los efectos crónicos, éstos pueden manifestarse incluso hasta años después de la exposición y se caracterizan por exposición a bajas dosis o dosis no letales durante años (Karam et al., 2004). Aunque los efectos crónicos, han sido menos estudiados, hay antecedentes que asocian la exposición a plaguicidas con actividad estrogénica y actividad androgénica (Androutopoulos et al., 2013), efectos inmunológicos (Corsini et al., 2013), problemas neurológicos (Hargreaves, 2012), efectos genotóxicos, capacidad mutagénica y su asociación en el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Alavanja et al., 2013). Además, se ha observado que puede afectar la salud reproductiva en varones, disminuyendo los niveles de testosterona y la concentración y cantidad de células espermáticas (Mathew et al., 2015). Así mismo, la exposición a plaguicidas se ha asociado con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, tales como Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, entre otras (Mostafalou y Abdollahi, 2013).

1.4 Estrés oxidativo y plaguicidas

Uno de los efectos fuertemente asociado con la exposición a plaguicidas es el estrés oxidativo (Shadnia et al., 2005; López et al., 2007; Lukaszewicz-Hussain, 2010; Saeidnia y Abdollahi, 2013). Se ha reportado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad de varios plaguicidas, entre ellos los plaguicidas OF, *N*-metilcarbamatos, OC, piretroides, triazinas, neonicotinoides y dithiocarbamatos, así como, en la estimulación de enzimas antioxidantes y lipoperoxidación en eritrocitos (Hernández et al., 2013).

Durante las reacciones de oxidación-reducción que ocurren en el organismo, ya sea por la biotransformación de plaguicidas a través de los CYP 450, exposición a agentes fisicoquímicos, exposición a radiaciones (UV, rayos X, rayos γ) (Devasagayam, 2004) o por procesos del sistema inmunológico, se lleva a cabo la transferencia de electrones para el equilibrio fisicoquímico. Aunque algunas veces esos procesos entran en desbalance y se generan *fugas*, es decir, escapes de electrones de alta energía, lo cual genera un aumento en la concentración de radicales libres (RL). Los RL son inestables en su último nivel de energía y tienen electrones desapareados, lo que los convierte en moléculas altamente reactivas (López, 2005). Estas moléculas reactivas se pueden clasificar de acuerdo a sus grupos funcionales o elementos más reactivos en especies reactivas de nitrógeno (RNS) o especies reactivas de oxígeno (ROS) y tienen capacidad de intervenir en procesos celulares como: funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, además de estar involucrados en la señalización y defensa contra patógenos, entre otras (Lagouge y Larson, 2013; Winterbourn, 2014; Lepetsos y Papavaassiliou, 2016).

Los ROS son generados de manera normal en el organismo por el metabolismo del oxígeno (tabla 1) y pueden participar en el ataque a patógenos (Lukaszewicz-Hussain, 2010; Saeidnia y Abdollahi, 2013). Sin embargo, un aumento de éstos puede ser potencialmente dañino por su capacidad de interactuar con macromoléculas, produciendo un efecto particular dependiendo del tipo de molécula con la que interactúan (lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos) (López, 2005).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno

Especie reactiva de oxígeno (ROS)	Simbolo	Vida media en el organismo	Generación/reactividad
Anión superóxido	O_2^-	10^{-6} seg	Se puede generar en mitocondria y en sistema cardiovascular.
Radical hidroxilo	$\cdot OH$	10^{-9} seg	Altamente reactivo y se puede generar con un exceso de hierro y bajo ciertas condiciones del organismo.
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	relativamente más estable	Se forma en el organismo mediante varias reacciones y genera especies muy reactivas como $\cdot OH$
Radical peroxil	$ROO\cdot$	*seg	Formado a partir de la oxidación de lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos, durante el daño oxidativo.
Oxígeno singlete	$\cdot O_2$	10^{-6} seg	Altamente reactivo, formado durante fotoexposición y reacciones químicas.
Ozono	O_3	*seg	Presente en la atmosfera, puede reaccionar con varias moléculas.

*Duración mayor a 1 segundo. Fuente: Devasagayam, 2004

ROS – lípidos: Las membranas lipídicas presentes en los organelos son altamente susceptibles a los efectos de los ROS. Una vez que reaccionan con los lípidos poliinsaturados, éstos sufren un proceso degenerativo conocido como lipoperoxidación o peroxidación lipídica (Devasagayam, 2004). Éste es un proceso complejo que envuelve la formación y propagación de radicales lipídicos, un rearrreglo de los dobles enlaces en los ácidos grasos poliinsaturados y la eventual destrucción de la membrana lipídica, lo que genera una variedad de productos, incluidos alcoholes, cetonas, alquenos y aldehídos, tales como el malondialdehído

(MDA) (Dianzani y Barrera, 2008). El MDA puede modificar las bases del ADN formando lesiones promutagénicas y contribuyendo a los efectos carcinogénicos y mutagénicos, así como, daño a proteínas (enzimas de reparación del ADN) por adición de grupos amino-lisina, sulfidril-cisteína e imidazol-histidina (Repetto et al., 2012).

ROS – proteínas: La oxidación de proteínas, puede originar productos tanto estables como reactivos, tales como proteínas hidroperóxicas que pueden generar radicales adicionales, particularmente a través de la interacción con metales de transición (Devasagayam, 2004). Así mismo, los ROS son capaces de oxidar las cadenas de aminoácidos que forman las proteínas, alterando su conformación espacial y por tanto su función (López, 2005).

ROS – ADN: Los ROS pueden inducir una variedad de daños al ADN, tales como ruptura de la cadena doble y sencilla, modificación de bases y sitios abásicos, además, los ROS están involucrados en mecanismos de envejecimiento celular y carcinogénesis (Pilger y Rüdiger, 2006). Una de las consecuencias más importantes de daño al ADN por ROS, es la inducción de transversiones de guanina a timina (Martínez et al., 2003), lo que genera un compuesto llamado 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, el cual es mutagénico (Pilger y Rüdiger, 2006).

Cuando los ROS exceden los niveles "basales" en el organismo, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo (Lukaszewicz-Hussain, 2010). El estrés oxidativo ha sido asociado con el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, trastornos cardiovasculares, disfunción del sistema endocrino y del sistema inmune, osteoporosis y cáncer, entre otras (Saeidnia y Abdollahi, 2013).

Para contrarrestar el efecto del estrés oxidativo, existen mecanismos de defensa antioxidantes, los cuales tienen la capacidad de retrasar o inhibir los procesos oxidativos, mediante la disminución en la concentración de ROS, lo que pudiera contrarrestar los efectos ocasionados por el estrés oxidativo (Antolovich et al., 2001).

1.4.1 Sistemas de defensa antioxidantes

Los sistemas de defensa antioxidante se clasifican en tres tipos: enzimáticos, no enzimáticos y los presentes en alimentos y vitaminas (Rahal et al., 2014).

Sistemas enzimáticos: Los sistemas enzimáticos son los que actúan de manera basal en el organismo, son la primera barrera de defensa que actúa contra el aumento de ROS (Rahal et al., 2014). Dentro de ésta clasificación encontramos a la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR).

Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) es una proteína dependiente de metales, que se encarga de catalizar la dismutación del anión superóxido formando H_2O_2 para que pueda ser fácilmente eliminado por otras enzimas (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). Existen 3 isoformas presentes en todas las células eucariotas: SOD1 o Cu-Zn-SOD presente en citoplasma, núcleo y espacio intermembranal de la mitocondria. La falla o mutación de esta isoforma está asociada con enfermedades neurodegenerativas (Afonso et al., 2007). SOD2 o Mn-SOD se localiza principalmente en la mitocondria y se encarga de la protección contra ROS generados por hipoxia (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). Varios polimorfismos asociados con una reducción en la actividad de esta isoforma han sido identificados en cardiopatías (Afonso et al., 2007), y la isoforma SOD3 o ExSOD, localizada principalmente en plasma, linfocitos y fluido cerebroespinal. Esta isoforma, es la encargada de la protección celular por aumento en la producción de ROS y de los efectos dañinos que estos puedan ejercer. Mutaciones en esta isoforma están relacionados con un aumento de riesgo en enfermedades cardiovasculares (Afonso et al., 2007).

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) es una enzima oxidoreductasa ubicua presente en varios tipos de células, pero con mayor actividad en hígado, riñón y eritrocitos (Bukowska et al., 2000). Esta enzima tiene un grupo hemo en su centro catalítico, está presente en eucariotas y en procariotas (Díaz, 2002). La CAT ejerce una función dual, por un lado, la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para formar H_2O y O_2 y por otro lado, la actividad peroxidica a través de la oxidación de

donadores de H^+ como el metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles, entre otros, con el consumo de 1 mol de peróxido (Aebi, 1984). La CAT protege a las células del H_2O_2 generado dentro de ellas y aun cuando no es esencial para algunas células bajo condiciones normales, juega un papel importante en la adquisición de la tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de la célula (Matés, 2000).

Glutación peroxidasa (GPx, EC 1.11.1.9) y glutación reductasa (GR, EC 1.6.4.2) constituyen un ciclo de óxido-reducción complementario. La GPx es una proteína tetramérica que tiene afinidad por los peróxidos (H_2O_2 o peróxidos lipídicos LOOH), contiene dentro de su sitio activo selenocisteína, en donde el azufre en la cisteína es reemplazado por el selenio (Day, 2009). Durante la inactivación de peróxidos, la enzima utiliza de sustrato 2 moléculas de glutación reducido (GSH), para formar H_2O y generar glutación oxidado (GSSG) unidos por un puente disulfuro. Esta molécula es capaz de volver a reducirse por medio de la enzima GR vía NADPH que se obtiene de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, lo que complementa este ciclo "antioxidante" (Pompella et al., 2003; Day, 2009).

Sistemas no enzimáticos: Los sistemas no enzimáticos son aquellas moléculas capaces de interactuar con los ROS sin la intervención de enzimas, es decir, contienen grupos o átomos que son afines a ROS. Dentro de estos sistemas encontramos al glutación reducido (GSH), ciertos ácidos grasos (Omega 3 y 6), metionina, Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) Adenosin-di-fosfato (ADP), adenosina, cisteína, albúmina, ácido úrico, entre otros (Matés, 2000).

Alimentos y vitaminas: Las vitaminas, al igual que los sistemas no enzimáticos, son capaces de donar electrones a especies oxidadas, neutralizando de esta manera su potencial oxidativo (Benitez, 2006). Dentro de estos elementos se encuentran el ácido ascórbico (Vitamina C), β -caroteno (Vitamina A), tocoferol (Vitamina E), coenzima Q-10, polifenoles y resveratrol, que pudieran obtenerse a través de los alimentos (López, 2005).

1.5 Daño genético y plaguicidas

El potencial genotóxico es un riesgo primario de la exposición a plaguicidas a largo plazo. Diversos estudios han demostrado que los plaguicidas OF tienen propiedades genotóxicas, alquilantes y clastogénicas (Ojha et al., 2011; Lu et al., 2012; Li et al., 2015). El estrés oxidativo, producto de la biotransformación de plaguicidas, puede causar daño al ADN, ya sea por modificaciones químicas y estructurales de las bases púricas y pirimídicas, o por rupturas de las cadenas dobles o sencillas del ADN, éste último pudiera ser de manera directa por los ROS o de manera indirecta por medio de la maquinaria de reparación del ADN (Réus et al., 2008). De igual manera, diversos estudios han evidenciado un aumento en el estrés oxidativo y su asociación en personas ocupacionalmente expuestas a plaguicidas (tabla 2).

la 2. Antecedentes de la relación estrés oxidativo-daño genético con la exposición a plaguicidas

País	Población	Resultado	Referencia
Irán	Pacientes intoxicados con plaguicidas OF.	Aumento en los niveles de MDA en los pacientes expuestos.	Ranjbar et al., 2005
Irán	Trabajadores en manufactura de plaguicidas.	Aumento en las enzimas SOD, CAT y GPx, así como también en la longitud de la cola de cometa y la longitud de cometa.	Shadnia et al., 2005
España	Agricultores expuestos a mezcla de plaguicidas.	Disminución de las enzimas SOD y CAT en la población con mayor índice de exposición.	López et al., 2007
Estados Unidos	Agricultores expuestos a plaguicidas OF.	La exposición a OF aumentó los niveles de MDA y la longitud y momento de la cola del cometa.	Muniz et al., 2008
Estados Unidos	Fumigadores y agricultores.	Aumento en niveles de MDA y la longitud y momento de la cola del cometa.	Kisby et al., 2009
Argentina	Fumigadores y agricultores.	Disminución en la enzima CAT y aumento del índice de daño genético en la población de estudio.	Simoniello et al., 2010
Egipto	Agricultores expuestos a mezcla de plaguicidas.	Disminución de la enzima GR y aumento en niveles MDA.	Mecdad et al., 2011

2 JUSTIFICACIÓN

Nayarit es uno de los estados con mayor uso de plaguicidas en el país y número de casos de intoxicaciones. Los plaguicidas más utilizados en la entidad son los OF, seguidos de piretroides y carbamatos. Un grupo constantemente expuesto a estos compuestos son los fumigadores. En la actualidad, existen antecedentes que refieren los efectos agudos y crónicos de los plaguicidas. Uno de los mecanismos a través del cual los plaguicidas ejercen sus efectos adversos es el aumento de estrés oxidativo. Por lo que en el presente estudio, se analizó la actividad acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BuChE), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), así como los niveles de MDA y su asociación con el daño al material genético, en fumigadores expuestos a plaguicidas en el estado de Nayarit. Este estudio sentará las bases para futuras investigaciones en poblaciones ocupacionalmente expuestas a estos compuestos, encaminadas a comprender los mecanismos a través de los cuales los plaguicidas ejercen su efecto, así como a mejorar las condiciones de trabajo y a reducir la exposición.

3 HIPÓTESIS

Los fumigadores expuestos a plaguicidas presentarán alteración en la actividad de enzimas antioxidantes, marcadores de estrés oxidativo y daño genético.

4 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de enzimas antioxidantes, marcadores de estrés oxidativo y daño genético, y su relación con la exposición a plaguicidas en fumigadores del estado de Nayarit, México.

4.1 Objetivos específicos

- 1) Evaluar la actividad acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) como biomarcadores de exposición a plaguicidas organofosforados en fumigadores urbanos del estado de Nayarit.
- 2) Evaluar la actividad de las enzimas con función antioxidante: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) en fumigadores del estado de Nayarit.
- 3) Evaluar los niveles de malondialdehído (MDA) como biomarcador de lipoperoxidación en fumigadores del estado de Nayarit.
- 4) Determinar el daño genotóxico ocasionado por la exposición a plaguicidas mediante el ensayo cometa en la población de estudio.

5 METODOLOGÍA

5.1 Diseño de estudio

Se realizó un estudio transversal, analítico y descriptivo en fumigadores urbanos del estado de Nayarit. Como criterios de inclusión se consideró que fueran fumigadores, mayores de 18 años de edad y que aceptaran participar de manera voluntaria en el estudio. A todos los participantes, se les informó por medio de pláticas sobre los objetivos de este estudio y se les proporcionó una carta de consentimiento informado que firmaron voluntariamente. Asimismo, se aplicó un cuestionario estructurado con la finalidad de obtener información relacionada con las características antropométricas de los participantes, y otras variables relacionadas con dieta, enfermedades y fuentes potenciales de exposición a plaguicidas y otros xenobióticos.

El grado de exposición se obtuvo a través de variables obtenidas por cuestionario y de una variable analítica que fue la actividad de la enzima BuChE. Con base en esto, se estratificaron tres grupos de estudio.

- Grupo de referencia: constituido por individuos que manifestaron no tener ningún tipo de contacto ocupacional con plaguicidas y su actividad BuChE estuvo dentro o por arriba de la media aritmética poblacional (5553.79 U/L).
- Grupo de exposición moderada: participantes que desarrollaban labores inherentes a la fumigación, en su mayoría abatizadores, que no utilizaban vehículos de fumigación y que además tenían una actividad BuChE dentro de la media aritmética poblacional (5553.79 U/L).
- Grupo de exposición alta: participantes que mencionaron tener actividades en la fumigación, principalmente la participación en las cuadrillas de fumigación, uso de vehículo, motobomba o motomochila, además algunos también tenían contacto con plaguicidas en actividades agrícolas y que su actividad BuChE estuviera por debajo de la media aritmética poblacional (5553.79 U/L).

5.2 Toma de muestra

Se obtuvieron 20 mL de muestra de sangre por punción venosa, los cuales fueron distribuidos para los diferentes biomarcadores y análisis clínicos (biometría hemática, perfil lipídico, perfil tiroideo y examen general de orina). Los análisis clínicos se realizaron en un laboratorio certificado. A partir de muestras obtenidas con EDTA, se hicieron alícuotas de sangre total para determinar la actividad AChE. Para la actividad de CAT, GR, y para la determinación del daño genético se utilizaron alícuotas de sangre total obtenidas con heparina como anticoagulante. A partir de las alícuotas sin anticoagulante, se obtuvo suero para la evaluar la actividad BuChE y para la determinación de SOD, GPx, y MDA se obtuvo plasma a partir de los tubos con heparina.

5.3 Determinaciones analíticas

5.3.1 Actividad acetilcolinesterasa

Reactivos:

- Buffer de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$) (0.1 M; pH 7.4)
- DTNB (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 Ellman et al. (1961) con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en la hidrólisis del sustrato acetiltiocolina por la AChE. Uno de los productos resultantes, la tiocolina, reacciona con un cromóforo, el ácido 5,5'-ditiobis-2nitrobenzoico (DTNB), dando lugar al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto cuyo color amarillo es estable y se puede leer a 436 nm. Para hacer más selectiva la actividad de la AChE se utilizó etopropazina.

Procedimiento:

Se realizó una dilución 1:100 de las muestras de sangre y el reactivo de dilución (triton X-100). Posteriormente se mezclaron 500 μL de la dilución con 1 mL de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.4), 50 μL de DTNB (10 mM) y 5 μL de etopropazina (6 mM). Se homogenizó la mezcla y se incubó a 37 °C durante 10 minutos, para después agregar 25 μL del sustrato yoduro de acetiltiocolina (28.3 mM). Se determinó el cambio de absorbancia a 436 nm, el cual fue monitoreado durante tres minutos en un espectrofotómetro "Spectronic Genesys 10Bio" (Wisconsin, USA) de Thermo Scientific. La actividad enzimática se corrigió por el contenido de Hb y se reportó como U/gr de Hb.

Para obtener la actividad se utilizaron los siguientes cálculos:

$$\Delta\text{abs} = \left(\frac{(\text{abs1} - \text{abs0}) + (\text{abs2} - \text{abs1}) + (\text{abs3} - \text{abs2})}{3} \right)$$

$$\text{AChE U/mL} = \left(\frac{\text{Vol. Total}}{(\text{E}) (\text{cm}) (\text{Vol. Muestra})} \right) \left(\frac{1 \times 10^6 \text{ umol}}{1 \text{ umol}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) \left(\frac{\Delta\text{abs}}{\text{min}} \right)$$

$$\text{AChE U/gr Hb} = \frac{\text{AChE (U/mL)}}{\left(\frac{\text{Hb (g/L)}}{100} \right)}$$

Donde:

Vol. Total = Volumen final de la reacción = 1.580 mL

E = $10.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de extinción molar del DTNB)

Cm = Ancho de la celda = 1 cm

Vol. de la muestra = Cantidad de hemolizado = 500 μL .

5.3.2 Actividad butirilcolinesterasa

Reactivos:

- Buffer de fosfatos ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$) (0.1 M, pH 7.4)
- DTNB (10 mM)
- Yoduro de S-butiriltiocolina (63.2 mM)

Fundamento:

La actividad BuChE se determinó de acuerdo con el método propuesto por Ellman et al. (1961) con algunas modificaciones. Este método, se basa en la hidrólisis del sustrato butiriltiocolina por la enzima butirilcolinesterasa. La tiocolina resultante reacciona con el cromóforo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), el cual genera un producto de reacción, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo con una absorbancia entre 405 y 420 nm de longitud de onda, con un óptimo a 405 nm.

Procedimiento:

Se mezclaron 3 mL de buffer de fosfatos (0.1 M a pH 7.4), 100 μL de DTNB (10 mM) y 10 μL de suero. La mezcla se incubó a 37 °C por 10 minutos, posteriormente se le agregó 50 μL de yoduro de S-butiriltiocolina (63.2 mM). El cambio de absorbancia a 405 nm fue monitoreado durante cuatro minutos en un espectrofotómetro "Spectronic Genesys 10Bio" (Wisconsin, USA) de Thermo Scientific. La actividad de BuChE fue reportada en U/L. Para la determinación de su actividad se utilizó el siguiente cálculo:

$$\Delta\text{abs} = \frac{(\text{abs1} - \text{abs0}) + (\text{abs2} - \text{abs1}) + (\text{abs3} - \text{abs2}) + (\text{abs4} - \text{abs3})}{4}$$
$$\text{BuChE U/L} = \left(\frac{\text{Vol. Total}}{(\text{E}) (\text{cm}) (\text{Vol. Muestra})} \right) \left(\frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1 \mu\text{mol}} \right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \right) \left(\frac{\Delta\text{abs}}{\text{min}} \right)$$

Donde:

Vol. Total = Volumen final de la reacción = 3.160 mL

$E = 10.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (coeficiente de extinción molar del DTNB)

Cm = Ancho de la celda = 1 cm

Vol. de la muestra = Cantidad de suero = 0.010 mL

5.3.3 Actividad superóxido dismutasa

Reactivos:

- Kit SOD assay kit-WST (Sigma-Aldrich 19160SOD)

Fundamento:

La SOD, cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. La determinación de la actividad de SOD, se llevó a cabo mediante el kit SOD Assay Kit-WST (Sigma-Aldrich 19160SOD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el reactivo WST-1 que produce una molécula de formazan, a partir de la reducción del anión superóxido. La tasa de reducción del anión superóxido es proporcional a la actividad que tiene la xantina oxidasa (XO), e inversamente es inhibida por la SOD. Por lo tanto, la inhibición en la actividad SOD puede ser medida indirectamente por este método colorimétrico.

Procedimiento:

Los volúmenes de soluciones de acuerdo al kit se describen en la tabla 3. La placa se incubó a 37 °C durante 20 minutos y se colocó en un lector de placas "µQuant Microplate Spectrophotometer" de Biotek, donde se leyó a 450nm.

Tabla 3. Ensayo enzimático de SOD

Reactivos	Muestra	Blanco 1	Blanco 2	Blanco 3
Muestra de plasma	20 µL	--	20 µL	--
H ₂ O dd	--	20 µL	--	20 µL
Solución de trabajo [tetrazolio soluble en agua (WST)]	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Solución de trabajo enzimático	20 µL	20 µL	--	--
Buffer de disolución	--	--	20 µL	20 µL

5.3.4 Actividad catalasa

Reactivos:

- H₂O₂ (30% Sigma-Aldrich)
- Buffer de fosfatos (Na₂HPO₄ – KH₂PO₄) (50 mM; pH 7)

Fundamento:

En un rango ultravioleta, el H₂O₂ muestra un incremento continuo en la absorción con la disminución de la longitud de onda. La descomposición del H₂O₂ puede determinarse directamente con la disminución en la absorbancia a 240 nm. Para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo (usualmente a los 30 seg), es necesario usar concentraciones relativamente bajas de H₂O₂. La actividad CAT corregida por hemoglobina se reporta en U/gr Hb.

Procedimiento:

La medición de la actividad CAT se realizó de acuerdo con el método propuesto por Aebi (1984). Se preparó una mezcla con 2.9 mL de peróxido de hidrógeno (10.34 mM) y 100 µL de lisado de eritrocitos previamente preparado (1/50 en buffer de fosfatos, 50 mM, pH 7.0). La reacción fue iniciada por la adición del lisado de

eritrocitos y se midió el cambio de absorbancia a 240 nm con intervalos de 15 segundos durante 1 minuto, en un espectrofotómetro "Spectronic Genesys 10Bio" (Wisconsin, USA) de Thermo Scientific, a una temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 1$.

5.3.5 Actividad glutatión peroxidasa

Reactivos:

- Glutathione peroxidase assay kit (Abcam ab 102530)

Fundamento:

La familia de enzimas de glutatión peroxidasa (GPx) juega un papel importante en la protección del daño oxidativo en los organismos. GPx convierte el glutatión reducido (GSH) en su forma oxidada (GSSG), mientras reduce hidroperóxidos lipídicos en sus correspondientes alcoholes, o peróxidos de hidrógeno libres en agua. La actividad GPx, se midió con el kit Glutathione Peroxidase Assay Kit (Abcam ab102530), siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de ~ 0.5 mU/mL ($R^2=0.9982$). El GPx reduce el hidróxido de cumeno mientras se oxida el GSH a GSSG. El GSSG generado es reducido de nuevo a GSH por consumo de NADPH y la GR. La disminución de NADPH (medible a 340 nm), es proporcional a la actividad GPx.

Procedimiento:

A partir de las alícuotas de plasma, se tomaron 20 μL de la muestra en una placa de 96 pozos y se llevó hasta 50 μL con el buffer de ensayo. Posteriormente, se añadió 40 μL del mix de reacción (33 μL de buffer de ensayo, 3 μL de solución NADPH 40 mM, 2 μL de solución de trabajo GR, 2 μL de solución de trabajo GSH) en cada pozo con muestra y se incubó durante 15 minutos. Por último, se agregaron 10 μL de hidroperóxido de cumeno para iniciar la reacción. Se llevaron a cabo dos lecturas a 340 nm en un lector de placas "µQuant Microplate Spectrophotometer" de Biotek. La segunda lectura se realizó después de incubar la reacción a 25°C durante cinco minutos y al momento de la lectura se protegió de la luz. Para determinar la actividad enzimática se utilizaron los siguientes cálculos:

$$B = \frac{A340 - (y - \text{intercepto})}{\text{Pendiente}}$$

$$\text{Actividad GPx} = \frac{B}{(t1 - t2) \times V} \times D$$

Donde:

B = Cantidad NADPH que disminuye entre t1 y t2 (nmol)

T1 = Tiempo de la primera lectura (min)

T2 = Tiempo de la segunda lectura (min)

V = Volumen de muestra pretratada agregada en los pozos de reacción (mL)

D = Factor de dilución de la muestra.

5.3.6 Actividad glutatión reductasa

Reactivos:

- Glutathione Reductase (GR) assay kit (Abcam ab 83461)

Fundamento:

La glutatión reductasa cataliza la reducción dependiente de NADPH del glutatión oxidado (GSSG), a glutatión reducido (GSH), el cual participa de manera importante en el ciclo redox del glutatión, manteniendo niveles adecuados de GSH. Una alta proporción de GSH/GSSG es esencial para la protección en contra del estrés oxidativo.

La actividad de GR, se llevó a cabo por medio del kit Glutathione Reductase (GR) Assay Kit (Abcam ab83461), siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de 0.1-40 mU/mL ($R^2=0.9992$). La GR reduce el GSSG a GSH, el cual reacciona con el 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) para generar TNB^{2-} , formando un complejo colorimétrico que se mide a una longitud de onda de 405 nm.

Procedimiento:

A partir de las alícuotas de sangre total, se tomaron 200 μL de sangre y se colocaron en hielo, se adicionaron 200 μL de buffer de ensayo incluido en el kit. Se centrifugó a 10,000 g por 15 minutos a 4 °C y se tomaron 100 μL del sobrenadante para el ensayo, el cual se colocó en hielo. Posteriormente, se le agregaron 5 μL de H_2O_2 al 3%, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos. Luego, se agregaron 5 μL de catalasa, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante otros cinco minutos. Se colocaron 2 μL de la muestra tratada en una placa de 96 pozos y se llevó a 50 μL con buffer de ensayo. Posterior a eso, se agregaron 50 μL del mix de reacción (40 μL de buffer de ensayo GR, 2 μL de solución DTNB, 2 μL de solución NADPH-GNERAT y 6 μL de solución GSSG) en cada uno de los pozos con muestra, para tener un total de 100 μL . Se llevaron a cabo tres lecturas a 405 nm en un lector de placas "µQuant Microplate Spectrophotometer" de Biotek. La primera inmediatamente después de agregar el mix de reacción, la segunda después de incubar a 25 °C durante cinco minutos, y una tercera medición después de 10 minutos. Para medir la actividad enzimática se utilizó el siguiente cálculo:

$$\text{Actividad GR} = \left(\frac{\Delta B}{(t_1 - t_2) \times 0.09 \times V} \right) \times \text{Factor de dilución de la muestra}$$

Donde:

ΔB = Cantidad de TNB de la curva estándar (nmol)

T_1 = Tiempo de la primera lectura (min)

T_2 = Tiempo de la segunda lectura (min)

V = Volumen de la muestra pretratada agregada a los pozos de reacción (mL)

0.9 = Factor de cambio de volúmenes durante el pretratamiento de la muestra.

5.3.7 Niveles del malondialdehído

Reactivos:

- Kit Lipid Peroxidation (MDA) assay kit (Sigma-Aldrich MAK085)

Fundamento:

La peroxidación lipídica, o lipoperoxidación, es la degradación de los lípidos, como resultado del daño oxidativo que ocurre por las especies reactivas de oxígeno, además de ser un marcador muy útil para determinar estrés oxidativo. Los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles a un ataque oxidativo, resultado de una cadena de reacción bien definida que termina en la producción de varios productos, entre ellos el malondialdehído (MDA).

El contenido de MDA se llevó a cabo por medio del kit Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Sigma-Aldrich MAK085), siguiendo las instrucciones del fabricante. La lipoperoxidación es determinada por la reacción del MDA con ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un producto colorimétrico medible espectrofotométricamente a 532 nm, que es proporcional al MDA presente en el organismo.

Procedimiento:

A partir de las alícuotas de plasma, se mezclaron 10 µL de plasma con 500 µL de H₂SO₄ 42 mM previamente preparado. Se agregaron 125 µL de una solución de ácido fosfotúngstico y se mezcló por medio de vortex. Posterior a esto, se incubó a temperatura ambiente durante cinco minutos y se centrifugaron las muestras a 13,000 g por tres minutos. Se separó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 100 µL de solución de agua/butilhidroxitolueno (BHT) previamente preparado, y se ajustó el volumen a 200 µL con agua destilada. Se agregaron 600 µL de la solución de TBA y se incubaron las muestras a 95 °C durante 60 minutos. Transcurrido el tiempo, las muestras se enfriaron en baño de hielo durante 10 minutos. Se tomaron 200 µL de cada muestra y se colocaron en placa de 96 pozos para su análisis. La cantidad de MDA presente en las muestras fueron leídas en un lector de placas

"µQuant Microplate Spectrophotometer" de Biotek a 532 nm. Los cálculos para determinar la concentración de MDA fueron los siguientes:

$$C = \left(\frac{S_2}{S_1} \right) \times D$$

Donde:

S_2 = Cantidad de MDA de la curva estándar (nmol)

S_1 = Volumen de la muestra agregada a los pozos de reacción

C = Concentración de MDA en la muestra

D = Factor de dilución.

5.3.8 Determinación del daño genotóxico

Reactivos:

- NaOH (10 M)
- EDTA (200 mM)
- Agarosa de bajo punto de fusión (0.5%)
- Agarosa regular (0.5%)
- Tritón X100
- Dimetilsulfóxido (DMSO ≥99.5%)
- EDTA- Na_2 (100 mM)
- Tris (10 mM)

Fundamento:

El daño genotóxico se evaluó a través del ensayo cometa siguiendo el método propuesto por Tice et al. (2000) con algunas modificaciones. El fundamento se basa en la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis, que posteriormente al ser observada en microscopio, presenta la apariencia de un cometa con una cabeza (región nuclear), y una cola (fragmentos

nucleares que han migrado a la dirección del ánodo) (Arencibia y Rosario, 2003). En las células no dañadas presenta una apariencia intacta y sin cola.

Procedimiento:

En portaobjetos con doble esmerilado, lavados previamente con detergente en polvo y agua, se les cubrió totalmente con 150 μ L de agarosa regular al 0.5% (0.25 gr de agarosa regular en 50 mL de agua inyectable) y se colocaron en estufa de secado a 50 °C durante 20 minutos. A partir de las alícuotas con heparina, se tomaron 20 μ L de sangre total y se le agregaron 150 μ L agarosa de bajo punto de fusión al 0.5%, la cual se mantuvo a una temperatura de 37 °C. Se agregaron 75 μ L de la mezcla (muestra y agarosa de bajo punto de fusión) en cada laminilla que tenía la capa de agarosa regular, se cubrió con cubreobjetos y se pusieron en refrigeración a 4 °C durante ocho minutos para que pudiera polimerizar. Una vez transcurrido el tiempo, se les retiró el cubreobjetos, se colocó otros 75 μ L de la mezcla, se les colocó el mismo cubreobjetos y nuevamente se llevó a refrigeración (4 °C durante ocho minutos). Posteriormente, se les retiró el cubreobjetos y se colocaron en vaso coplin con solución de lisis (NaCl 2.5 M, EDTA-Na₂ 100 mM y Tris 10 mM, pH>10) durante 24 horas, cubiertas de la luz y en refrigeración (4 °C).

Posteriormente, las laminillas se colocaron en una cámara de electroforesis cubiertas por buffer de electroforesis (NaOH 10 M, EDTA-Na₂ 200 mM pH>13). Se dejaron durante 20 minutos para desenrollamiento, posteriormente 20 minutos más para electroforesis a 25v, 300mA y a continuación se lavaron las laminillas con buffer de neutralización (Tris 0.4 M pH 7.5) dos veces, y otras dos veces más con etanol al 96%. Finalmente, a las laminillas, se les añadió 20 μ L de EtBr (1 mg/5 mL) para su lectura, la cual se realizó en un microscopio de fluorescencia "Carl Zeiss Axio Scope A1" (Gottingen, Germany) con el objetivo de 20X. El análisis se realizó en ciego y al azar con el software "Comet Imager versión 2.2". Se contaron 200 células en total, incluidas cometas y nubes celulares (células sin núcleo definido). Se contaron 50 cometas por laminilla, no se tomaron en cuenta células que estaban en los bordes, partes dañadas del gel, cometas superpuestos y nubes celulares. Como parámetros de genotoxicidad se determinaron: la longitud de la cola (migración de ADN), el

porcentaje de ADN (%ADN que se encuentra en la cola del cometa), el momento de la cola del cometa (producto de la longitud de la cola del cometa y el %ADN), y el momento de la cola de Olive (resta de la distancia entre el centro de la cabeza del cometa y el centro de la cola del cometa entre el %ADN en la cola del cometa).

5.4 Análisis estadístico

Las características demográficas, así como el estilo de vida (edad, alimentación, hábitos nocivos, horas por semana trabajando entre otras) fueron analizadas descriptivamente en promedios, medias y porcentajes. Las medias y errores estándar fueron calculados para cada grupo y para cada biomarcador. La actividad de AChE, BuChE, las actividades antioxidantes, niveles de MDA y los parámetros de daño al material genético (longitud de la cola de cometa, %ADN, momento de la cola y momento de la cola de Olive) fueron analizados mediante pruebas paramétricas (ANOVA, Bonferroni) y no paramétricas (U-Mann Whitney, Kruskal-Wallis y Posteriori de Dunn) en los paquetes estadísticos Stata 12 (Stata Statistical Software, Stata Corporation, College Station Texas) y GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc), de acuerdo a la distribución y comportamiento de las variables. Todos los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. En el caso de los análisis bivariados se hizo uso de las variables confusoras para el análisis de las diferentes asociaciones.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características generales de la población

La población de estudio consistió de 208 participantes, los cuales se dividieron en grupos de acuerdo a su exposición a plaguicidas como se mencionó en la sección anterior. El grupo de referencia consistió de 22 participantes, el grupo de exposición moderada de 126 y de 60 participantes el grupo de exposición alta. En cuanto al género, participaron 139 hombres y 69 mujeres, con una media geométrica de edad de 36.2 y 36.4 años, respectivamente (tabla 4). Al respecto, existen estudios con poblaciones ocupacionalmente expuesta a distintos tipos de plaguicidas, en los que se ha observado que la mayoría de la población suele ser del género masculino (Grover et al., 2003; Piperakis et al., 2005; Salvador et al., 2008; Simonello et al., 2010), tendencia que puede deberse a las intensas tareas que suele haber dentro de la fumigación, así como los horarios en los que se desempeñan.

Referente al índice de masa corporal (IMC), la media geométrica en los grupos de referencia, moderada y alta exposición fue de 28.6, 29.5, y 28.8 Kg/m², respectivamente. De acuerdo a los parámetros establecidos por la OMS el 18.3% de la población de estudio se encuentra en la clasificación de peso normal, 34.6% con sobrepeso, mientras que el 47.1% presenta algún grado de obesidad, lo cual puede tener implicaciones en la salud de los participantes (OMS, 2006). En cuanto a los hábitos nocivos de la población de estudio, el 21.6% refirió fumar en la actualidad, mientras que 50% dijo haber fumado en algún momento de su vida. De igual manera, el 79.3% de los participantes conviven con personas que fuman, es decir, son fumadores pasivos, lo que también representa un riesgo para su salud. El hábito de fumar es un generador importante de oxidantes que pueden aumentar la producción de ROS lo que pudiera resultar en daño oxidativo (Abdalla et al., 2012). En cuanto al consumo de bebidas alcohólicas, el 86.5% del total de los participantes refirió consumirlas.

Con respecto al consumo de alcohol, se observó que los tres grupos de estudio, tuvieron porcentajes similares de participantes que consumen habitualmente bebidas

alcohólicas. Este tipo de tendencia se ha visto en otros estudios con poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas (Grover et al., 2003; Salvador et al., 2008; Simoniello et al., 2010; Hernández et al., 2013; Sharma et al., 2013), lo que podría indicar que los fumigadores frecuentemente consumen alcohol o tabaco, lo cual puede ser un factor de riesgo adicional a la exposición que influye en la salud de este tipo de poblaciones.

En cuanto al uso de plaguicidas, los compuestos más utilizados son los OF, seguido de los piretroides y carbamatos (tabla 5). Dentro de los OF, se destaca el uso de compuestos que la OMS clasifica como altamente peligrosos (Ib), concretamente clorpirifos, paratión y metamidofos. Estos datos son consistentes con los reportados en el año 2010, en un estudio llevado a cabo en el estado de Nayarit, en el que se observó que los plaguicidas más vendidos y utilizados son los OF, seguido de los piretroides y carbamatos (González-Arias et al., 2010).

En este estudio se observó que la población de estudio tiene en promedio 3.5 años dedicándose a la labor de fumigación, el 48.1% son trabajadores con una antigüedad que va de los 5 a los 48 años, 38% de 1 a 5 años y 13.9% tienen menos de un año laborando. En este sentido, también se observó que existen dos situaciones laborales, los que su trabajo depende de un contrato, es decir que son trabajadores temporales (52.1%) y los que son de base o trabajadores permanentes (47.8%). Los trabajadores temporales son generalmente los que realizan las actividades de fumigación más intensas. Este tipo de datos, por lo general, no se menciona en la literatura, pero puede ser de importancia, debido a que el tiempo de exposición, así como el trabajo realizado suelen ser distintos en cada grupo, y probablemente verse reflejado en la salud de los trabajadores.

Con respecto al equipo de protección, la mayoría de los participantes no hacen uso de éstos durante las labores de fumigación (tabla 6). Mientras que los participantes que sí mencionan su uso, reportan el uso de sombrero o gorra (71%), utilizados en el grupo de exposición moderada y 72.4% en el grupo de exposición alta. Esta tendencia también se observó en un estudio realizado por Suybros et al., (2012), en una población de agricultores de vegetales, expuestos a plaguicidas OF y

carbamatos, en el que los participantes al igual que en la población del presente estudio, no usaban equipo de protección como lentes de seguridad, o guantes, sin embargo, si utilizaban botas o camisas de manga larga. Lo anterior sugiere una falta de sensibilización por parte de la población con respecto a su seguridad ocupacional, por lo que la implementación de cursos y pláticas de buen manejo de plaguicidas, sería un método adecuado para concientizar a la población.

6.2 Actividad de colinesterasas

En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos de la actividad AChE y BuChE en la población de estudio. Con respecto a la actividad AChE, la media geométrica en el grupo de referencia fue de 18.8 U/gr Hb, 19.4 U/gr Hb en el grupo de exposición moderada y de 20.5 U/gr Hb en el grupo de exposición alta. De acuerdo a los valores de referencia manejados en el laboratorio y que fueron obtenidos de personas no expuestas ocupacionalmente a plaguicidas (17-45 U/gr Hb), el 12.5% de los participantes tuvieron actividad AChE por debajo de los valores mínimos inferiores, del cual, el 11.5% corresponde al grupo de referencia, el 65.4% al grupo de exposición moderada y el 23.1% al de exposición alta (figura 2a). En cuanto a la actividad BuChE, el promedio de la actividad en el grupo de referencia fue de 6673.3 U/L, de 5944 U/L en el grupo de exposición moderada y de 4333.2 U/L en el grupo de exposición alta. Con respecto a los valores de referencia establecidos para hombres y mujeres mayores de 40 años, así como para mujeres no embarazadas, (4300-5400 U/L) el 16.8% de los participantes estuvieron por debajo de los valores de referencia, del cual, el 34.3% corresponde al grupo de exposición moderada y 65.7% al grupo de exposición alta (figura 2b).

La enzima AChE es una serina hidrolasa principalmente encontrada en las conexiones neuromusculares, sinapsis colinérgicas cerebrales y más recientemente descrita en linfocitos (Kawashima y Fujii, 2000; Colovic et al., 2013).

Tabla 4. Características generales de la población de estudio

Características	Grupo de referencia	Exposición moderada	Exposición alta	p
N	22	126	60	
Género				0.09
Mujeres [n (%)]	5 (22.7%)	49 (38.9%)	15 (25%)	-
Hombres [n (%)]	17 (77.3%)	77 (61.1%)	45 (75%)	-
Edad* años (rango)	34.9 (20-68)	37.3 (20-67)	34.7 (20-57)	0.16
IMC** media geométrica (rango)	28.2 (20.1-39.9)	29.5 (19.0-45.5)	28.8 (20.4-54.4)	0.25
Bajo peso	--	--	--	0.0001
Peso normal [n (%)]	5 (22.7)	18 (14.3)	15 (25)	0.0001
Sobrepeso [n (%)]	8 (36.4)	43 (34.1)	21 (35)	0.0001
Obesidad [n (%)]	9 (40.9)	65 (51.6)	24 (40)	0.0001
Escolaridad*	14.8 (9-19)	11.5 (5-19)	11.5 (8-19)	0.0001
Fumadores activos [n (%)]	8 (36.4)	18 (15.1)	19 (31.7)	0.0093
Fumadores pasivos [n (%)]	21 (95.4)	90 (73.8)	50 (84.7)	0.03
Consumo de alcohol [n (%)]	20 (90.9)	105 (83.3)	55 (91.7)	0.77
Consumo de drogas [n (%)]	-	7 (5.6)	5 (8.3)	0.51

* Los valores se presentan como medias geométricas. * De acuerdo a los parámetros de la OMS: bajo peso (<18.5 kg/m²), peso normal (>18.5 kg/m² y <24.9 kg/m²), sobrepeso (>24.9 kg/m² y <29.9 kg/m²) y obesidad (>30 kg/m²).

Tabla 5. Plaguicidas más utilizados por la población de estudio

Plaguicidas	Uso N (%)	Clasificación OMS*
Organofosforados	63.3%**	
Temefos	151 (52.9)*	III
Clorpirifos	100 (35.1)*	Ib
Malatión	20 (7.1)*	III
Paratión	10 (3.5)*	Ib
Metamidofos	3 (1.1)*	Ib
Acefato	1 (0.3)*	III
Piretroides	29.8%**	
Deltametrina	76 (56.7)*	II
Lambdacialotrina	31 (23.1)*	II
Permetrina-esbioaletrina	20 (14.9)*	IV
Fenotrina	4 (3.0)*	II
Cipermetrina	2 (1.5)*	II
Bifentrina	1 (0.7)*	II
Carbamatos	3.8%**	
Bendiocarb	11 (64.7)*	II
Propoxur	5 (29.4)*	III
Carbofurano	1 (5.8)*	Ib
Otros	3.1%**	

*Porcentaje de participantes que usa los plaguicidas considerando los grupos químicos (OF, piretroides, carbamatos, otros)

**Porcentaje de participantes que usa los plaguicidas en cada uno de los grupos químicos.

*Clasificación de la OMS: clase Ia (extremadamente peligrosos); clase Ib (altamente peligrosos); clase II (moderadamente peligroso); clase III (ligeramente peligroso); clase IV (poco probable de ser peligroso)(OMS, 2009).

Tabla 6. Frecuencia de uso de equipo de protección

Equipo	Exposición moderada				Exposición alta				p
	Nunca	Raramente	Muy seguido	Siempre	Nunca	Raramente	Muy seguido	Siempre	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Overol	90 (95.7)	1 (1.0)	-	3 (3.2)	56 (98.2)	1 (1.8)	-	-	0.39
Sombrero o gorra	19 (20.4)	3 (3.2)	5 (5.4)	66 (71.0)	12 (20.7)	3 (5.2)	1 (1.7)	42 (72.4)	0.91
Cubrebocas	55 (59.1)	15 (16.3)	4 (4.3)	19 (20.4)	33 (55.9)	11 (18.6)	6 (10.2)	9 (15.3)	0.88
Guantes	81 (86.1)	7 (7.5)	-	6 (6.4)	52 (89.7)	-	1 (1.7)	5 (8.6)	0.61
Botas	77 (81.9)	2 (2.1)	3 (3.2)	12 (12.8)	52 (89.7)	1 (1.7)	-	5 (8.6)	0.20
Lentes de seguridad	72 (78.3)	11 (11.9)	3 (3.3)	6 (6.5)	44 (75.8)	5 (8.6)	1 (1.7)	8 (13.8)	0.59
Otros	45 (93.8)	-	-	3 (6.2)	32 (84.2)	-	-	6 (15.8)	0.15

La determinación de la actividad AChE en sangre es de gran importancia en el diagnóstico de intoxicación causado por inhibidores reversibles e irreversibles de esta enzima, incluidos los plaguicidas OF y carbamatos (Murussi et al., 2014). Sin embargo, se ha visto que la determinación de AChE no es tan sensible como biomarcador de exposición a mezclas de compuestos (Bernal-Hernández et al., 2014). Los resultados de este estudio concuerdan con los reportados en poblaciones de agricultores y fumigadores expuestos a plaguicidas OF (Shadnia et al., 2005; Bernal-Hernández et al., 2014; Singleton et al., 2015) en los que no se observaron diferencias en la actividad AChE en los grupos expuestos con respecto al grupo control. Por otro lado, se han reportado estudios en agricultores expuestos a diversos plaguicidas, tales como OF, carbamatos y piretroides (López et al., 2007; Naravaneni y Jamil, 2007; Simoniello et al., 2010), en los que se ha observado una disminución de más del 15% en la actividad AChE, por lo que la refieren como buen biomarcador de exposición crónica a plaguicidas OF y carbamatos. Así también, varios estudios han demostrado que los niveles de AChE pueden variar dentro de las mismas poblaciones, ya sea por la temporada de fumigación, el consumo de alcohol, o simplemente por diferencias individuales con respecto a la enzima (Zeljezic et al., 2007).

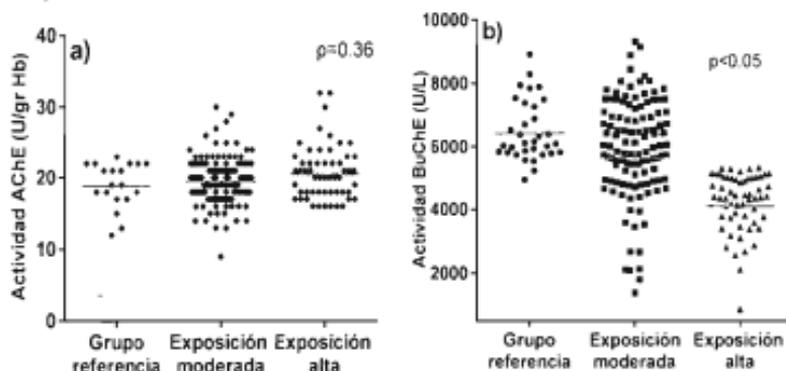


Figura 2. Actividad AChE (a) y BuChE (b) en la población de estudio de acuerdo al grado de exposición. Las gráficas muestran el valor promedio de cada uno de los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y ANOVA, respectivamente.

Algunos estudios en poblaciones mexicanas donde han evaluado la actividad de AChE en agricultores (Tinoco-Ojanguren y Halperin, 1998; Rendón-von Osten et al., 2004; Gamlin et al., 2007), se ha encontrado una disminución significativa en la actividad de AChE en los diferentes grupos expuestos principalmente a OF y carbamatos, discutiendo también la necesidad de campañas de información acerca de los plaguicidas y las buenas prácticas del uso de estos compuestos (Sánchez-Guerra et al., 2011).

Por otra parte, la actividad BuChE se ha propuesto como complemento para la evaluación de exposición a plaguicidas anticolinesterásicos; los antecedentes de la literatura sugieren que BuChE tiene mayor sensibilidad y confiabilidad en la evaluación de exposición a diferentes mezclas de plaguicidas, así como en diferentes escenarios de exposición. Lo anterior se sustenta en los trabajos realizados en jornaleros indígenas expuestos a OF y carbamatos (Bernal-Hernández et al., 2014), agricultores expuestos a OF y carbamatos (Miranda-Contreras et al., 2013), floricultores expuestos a piretroides, OF y carbamatos (Aroonvilairat et al., 2015), así como en agricultores de algodón expuestos a OF (Singleton et al., 2015).

6.3 Enzimas antioxidantes

Actividad catalasa y superóxido dismutasa

En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas antioxidantes CAT y SOD en la población de estudio. La actividad CAT tuvo una media geométrica de 92.9 U/gr Hb en el grupo de referencia, 71.5 U/gr Hb en el grupo de exposición moderada y de 59.9 U/gr Hb en el grupo de exposición alta ($p=0.09$) (figura 3a). En cuanto a la actividad SOD, la media geométrica fue de 111.9 U/mL en el grupo de referencia, 132.7 U/mL en el grupo de exposición moderada y 91.7 U/mL en el grupo de exposición alta ($p=0.07$) (figura 3b). En las tablas 7 y 8 se presentan los análisis de regresión logística de las enzimas CAT y SOD, con variables como características antropométricas, uso de plaguicidas, variables del tipo

clínico como el colesterol, fórmula blanca y roja, así como la actividad de colinesterasas y parámetros de daño genotóxico.

En este estudio se observó que la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en los participantes con mayor grado de exposición a plaguicidas fueron marginalmente menores, comparadas con el grupo de referencia ($p=0.09$; $p=0.07$ respectivamente).

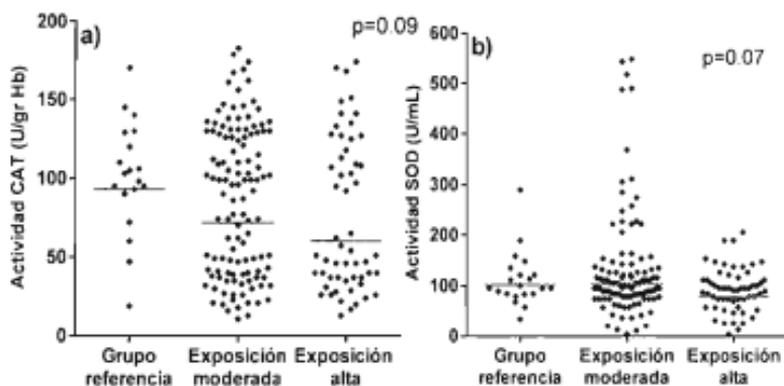


Figura 3. Actividad CAT (a) y SOD (b), en la población de estudio. Las gráficas muestran el valor promedio de cada uno de los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

La CAT es una proteína soluble presente en los eritrocitos, que participa en la descomposición del peróxido de hidrogeno (H_2O_2) para poder formar agua (Karademir et al., 2007). Los resultados de la actividad CAT obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Ranjbar et al. (2002), López et al. (2007) y Ogut et al. (2013) en poblaciones ocupacionalmente expuesta a compuestos OF, carbamatos y piretroides, en los que se observó una disminución en la actividad CAT de la población que tenía mayor grado de exposición a plaguicidas principalmente OF, sugiriendo que esta enzima es susceptible a cambios por la exposición a estos compuestos.

Tabla 7. Análisis de regresión logística modelando la actividad enzimática de catalasa ($\leq 69.77 \text{ U/gr Hb}$ / $> 69.77 \text{ U/gr Hb}$)*

Enzima	Variable	OR	p
CAT dicotómica	Características de la población		
	IMC	1.080	0.011
	Alergias	2.073	0.048
	Orina con mucha frecuencia	2.649	0.014
	Alimentación y hábitos nocivos		
	Consumo de agua (L/día)	1.320	0.017
	Consumo de cerveza	0.714	0.015
	Comidas diarias	0.630	0.051
	Exposición y equipo de protección		
	Uso actual de Ikon	0.311	0.014
	Uso pasado de paratión	5.474	0.034
	Contacto anterior con plaguicidas	2.964	0.000
	Parámetros clínicos y bioquímicos		
	Actividad BuChE (U/L)	1.0002	0.008
	Colesterol (mg/dL)	1.007	0.037
	Calcio (mg/dL)	0.082	0.000
	Fosforo (mg/dL)	1.902	0.028
	Índice de exposición**	0.506	0.008
	Leucocitos (mm^3)	1.0002	0.015
	Linfocitos (mm^3)	1.0005	0.009

* El corte fue realizado con base en la media geométrica poblacional de la actividad enzimática. **El índice de exposición se obtuvo de variables obtenidas por cuestionario y la actividad BuChE.

En el análisis estadístico logístico, la CAT se asoció con el uso de plaguicidas, lo que pudiera sugerir el papel de esta enzima en la defensa contra la exposición a estos compuestos (tabla 7). La exposición a plaguicidas puede modificar directa o indirectamente la capacidad de defensa antioxidante de individuos expuestos y por tanto, afectar la susceptibilidad al estrés oxidativo (Sharma et al., 2013). Los datos disponibles en estudios con animales e *in vitro*, indican que las enzimas con mecanismo de defensa antioxidante son alteradas por la exposición a plaguicidas (Simoniello et al., 2010). Un mecanismo que pudiera explicar el comportamiento de CAT es que los ROS generados por la exposición a plaguicidas pueden unirse directamente al grupo tío de la enzima e inhibir su actividad y por ende predisponer a efectos dañinos en la salud humana (Kono y Fridovich, 1982, López et al., 2007; Ogut et al., 2011). Este mecanismo pudiera explicar el comportamiento de la

actividad CAT en nuestra población de estudio, debido a que ambas enzimas, tanto CAT como SOD, trabajan de manera conjunta para eliminar ROS, por lo que al disminuir la actividad SOD, puede verse afectada la actividad CAT. Así mismo se ha observado que la actividad de la enzima puede ser regulada por la proteína p53 y el gen 3 que induce p53 (*PIG3*), donde la actividad de CAT es disminuida cuando se sobre-expresa *p53* y *PIG3* lo que incrementa los niveles de ROS (Kodydková et al., 2014). Esto pudiera tener un efecto co-dependiente en procesos carcinogénicos, ya que se ha observado que una desregulación de enzimas antioxidantes como CAT son determinantes en la transformación de células neoplásicas y de igual manera, cuando se da la proliferación de células transformadas, éstas incrementan los niveles de H_2O_2 y pueden disminuir la actividad de CAT en comparación con las células normales (Kodydková et al., 2014). Otros mecanismos por los que pudiera verse afectada la actividad de CAT son los procesos inflamatorios y epigenéticos. Al respecto, Min et al. (2010) observaron hipermetilación de islas CpG en el promotor de CAT durante exposiciones prolongadas a ROS, lo que también podría explicar la disminución en la actividad de la misma.

En el caso de la enzima SOD, López et al. (2007), en un estudio con agricultores expuestos a carbamatos, OF y piretroides, encontraron que ésta al igual que en presente estudio, disminuyó en los participantes con un mayor índice de exposición. La SOD es una enzima metal-dependiente que cataliza la remoción del anión superóxido (O_2^-), para generar peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como producto final de una dismutación (Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009). Estudios *in vitro* como el de Santi et al. (2011) encontraron que la actividad de la enzima SOD disminuyó de manera dependiente de concentración y exposición al herbicida clomazon. Este comportamiento puede ser debido a la producción de ROS durante la biotransformación de plaguicidas, ya que éstos, pueden unirse directamente al grupo tiol de la CAT (Kono y Fridovich, 1982), lo que ocasiona un aumento en la concentración de H_2O_2 , el cual puede inhibir la enzima SOD (López et al., 2007). La inhibición de SOD puede afectar significativamente los mecanismos de defensa contra el ataque de radicales libres en células vivas, tal como los eritrocitos (Santi et al., 2011). En exposición crónica a plaguicidas OF, se ha observado un

comportamiento similar que en exposición aguda, puesto que en ambas se observa una disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes, debido a que las especies reactivas de oxígeno presentes en el organismo son capaces de inhibirlas (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Contrario a este estudio, diversos resultados en la literatura, mostraron un aumento en la actividad de SOD en poblaciones de fumigadores y agricultores con altos índices de exposición a plaguicidas OF, piretroides y carbamatos (Vidyasagar et al., 2004; Shadnia et al., 2005; Ogut et al., 2011; Sharma et al., 2013; Wafa et al., 2013) lo que podría sugerir un efecto compensatorio en exposición crónica a estos plaguicidas por parte de esta enzima.

En el análisis de regresión logística (tabla 8) se encontraron asociaciones con el uso de plaguicidas, pero también con algunos parámetros clínicos como el perfil lipídico, particularmente con LDL. En cuanto a la regulación de la expresión génica de SOD, existen tres genes que codifican para tres enzimas distintas en humanos: *sod1* la cual codifica para SOD dependiente de cobre y zinc (Cu-Zn SOD), *sod2* la cual codifica para SOD dependiente de manganeso (MnSOD) y *sod3*, que codifica para SOD extracelular (ExSOD) (Afonso et al., 2007).

Se ha visto que esta enzima es regulada por diversos factores de transcripción tales como factor nuclear kappa beta (NF- κ B), activador de proteína 1 y 2 (AP-1 y AP-2), proteína específica (SP-1) y receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma (PPAR γ) (Miao y Clair, 2009). Ding et al. (2007), encontraron que al bloquear a PPAR γ se desregulan los niveles de mRNA y proteína de MnSOD, lo que pudiera disminuir su capacidad protectora contra el daño oxidativo en cardiomiocitos. Se ha encontrado también que el incremento de ROS puede ser suprimido por la activación de PPAR γ , debido a que éste se encarga de regular los niveles de mRNA y proteína SOD (Jo et al., 2006). También se ha observado que el estado de metilación en el gen *sod1*, es decir su silenciamiento epigenético, pudiera ser un mecanismo común en la generación de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (Oates y Pamphlett, 2007). En un modelo de cáncer de piel, la sobre-expresión del gen *sod2* en ratones transgénicos resultó en una incidencia de reducción de tumores suprimiendo la activación de la proteína AP-1, mientras que la deficiencia de MnSOD aumentó los

niveles de AP-1 y p53, así como también incrementó la proliferación y los eventos de apoptosis (Zhao et al., 2002).

Tabla 8. Análisis de regresión logística modelando la actividad enzimática superóxido dismutasa (≤ 94.78 U/mL / >94.7 U/mL)*

Enzima	Variable	OR	p
SOD dicotómica	Exposición y equipo de protección		
	Uso pasado de paratión	4.878	0.043
	Comidas durante jornada laboral	2.491	0.015
	Parámetros clínicos y bioquímicos		
	Actividad AChE (U/gr Hb)	1.105	0.033
	Basófilos (mm^3)	1.011	0.048
	Colesterol (mg/dL)	1.008	0.049
	Índice aterogénico**	1.256	0.047
	LDL (mg/dL)	1.014	0.008
	Lípidos totales (mg/dL)	1.001	0.048
	Monocitos (%)	0.830	0.017
	Proteína sérica	0.445	0.033

* El corte fue realizado con base en la media geométrica poblacional de la actividad enzimática. **El Índice aterogénico se obtuvo mediante la proporción de colesterol total (mg/dL) en el organismo y los niveles de colesterol HDL.

Actividad glutatión peroxidasa y glutatión reductasa

En la figura 4 se presentan los resultados de la actividad GPx en la población de estudio. En este estudio se observó una media geométrica de 215.2 U/mL en el grupo de referencia, 201.2 U/mL en el grupo de exposición moderada y 188.3 U/mL en el grupo de exposición alta. La GPx, es la mayor molécula antioxidante involucrada en la inactivación de metabolitos peróxidos endógenos como el H_2O_2 y adicionalmente está involucrada en el ciclo redox de la GSH en presencia de GR (Sharma et al., 2013).

Contrario a lo observado en este trabajo, existen estudios que refieren un aumento en la actividad GPx en un grupo de formuladores de plaguicidas *versus* un grupo control (29.3 U/gr Hb vs 24.9 U/gr Hb) (Shadnia et al., 2005), en agricultores

U/gr Hb) (Ogut et al., 2011) y en fumigadores urbanos expuestos a OF, carbamatos, OC y piretroides, *versus* controles (27.1 U/mg Hb vs 17.5 U/mg Hb) (Sharma et al., 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos de este trabajo son similares a los reportados por López et al. (2007) en agricultores expuestos a carbamatos, OF y piretroides, en los que no parece verse afectada la enzima por la exposición a plaguicidas.

La baja actividad de esta enzima puede deberse a la disminución en la concentración de GSH, lo cual indicaría una medida adaptativa para contrarrestar la toxicidad mediada por ROS, y de igual manera, pudiera deberse a un aumento en la producción de H₂O₂ en individuos expuestos a plaguicidas (Sharma et al., 2013). Con respecto a lo observado en el presente estudio, pudiera ser que la actividad GPx no tuvo cambio alguno debido a los niveles de GSH de los participantes, aunque serían necesarios más estudios para confirmar dicha hipótesis

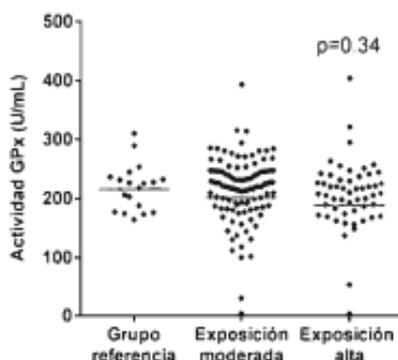


Figura 4. Actividad-GPx en la población de estudio. La gráfica muestra el valor promedio de cada uno de los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

En la tabla 9 se presentan los datos del análisis de regresión logística de la enzima GPx con diversas variables analizadas. En el análisis se observó que la enzima está asociada con el género, así como con el consumo de comidas diarias. Al ser una enzima selenio dependiente, la actividad de ésta puede verse afectada por la deficiencia de selenio. La expresión de selenoproteínas es tejido-específica y es modulada transcripcionalmente por la disponibilidad de selenio a nivel de traducción (Flohé et al., 1997), la cual puede verse afectada por la alimentación de las personas (Navarro-Alarcon y Cabrera-Vique, 2008) por lo que pudiera ser que la alimentación que tienen los participantes de este estudio es lo suficientemente buena para ayudar con la actividad antioxidante. La enzima GPx también se encarga de inactivar hidroperóxidos lipídicos y otros hidroperóxidos solubles después de la liberación de la membrana lipídica (Lubos et al., 2011). A pesar de que moléculas reactivas tales como O_2^- y el peroxinitrito ($ONOO^-$) pueden inhibir la actividad de la GPx, estudios *in vitro* han demostrado, que esta inhibición puede ser prevenida por la intervención de GSH (Lubos et al., 2011).

Tabla 9. Análisis de regresión logística modelando la actividad enzimática glutatión peroxidasa (≤ 198.68 U/mL / >198.68 U/mL)*

Enzima	Variable	OR	p
GPx dicotómica	Características de la población		
	Género	0.506	0.035
	Hábitos nocivos		
	Fumar en el pasado	2.303	0.016
	Hábitos alimenticios		
	Comidas diarias	1.897	0.009
	Exposición y equipo de protección		
	Antigüedad en años	1.068	0.039
	Uso pasado de bendiocarb	3.294	0.027
	Uso pasado de K-otrin	3.099	0.025

* El corte fue realizado con base en la media geométrica de la actividad enzimática.

Al igual que las enzimas anteriormente mencionadas, la regulación del gen que codifica para GPx, pudiera estar modulada por la interacción de ROS o por procesos inflamatorios. Mecanismos oxidativos pueden regular la transcripción del gen de GPx

mediante los sitios NF- κ B y AP1 en el promotor, este último involucrando factores nucleares como c-Jun y c-Fos, los cuales son sensibles a redox y pueden inactivar por oxidación los residuos de cisteína necesarios para la actividad de unión al DNA (Lubos et al., 2011).

Con la finalidad de conocer su comportamiento debido a la poca información existente de esta enzima en la literatura la actividad GR fue analizada tanto en sangre total como en plasma (figura 5a y 5b). La media geométrica de la actividad GR en sangre total fue de 36.4 U/gr Hb en el grupo de referencia, 40.1 U/gr Hb en el grupo de exposición moderada y 37.6 U/gr Hb en el grupo de exposición alta. En cuanto a su actividad en plasma, se observó una media geométrica de 5.8 U/mL en el grupo de referencia, 5.8 U/mL en el grupo de exposición moderada y una media geométrica de 6.1 U/mL en el grupo de exposición alta. En las tablas 10 y 11 se presentan los análisis bivariados de la actividad GR en sangre total y en plasma. Los datos muestran asociaciones entre la actividad de estas enzimas con el uso de plaguicidas y de equipo de protección, así como también con la actividad enzimática de CAT.

Son pocos los estudios en los que se ha evaluado la actividad GR en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas. Al respecto, López et al. (2007) no observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de GR en agricultores expuestos a carbamatos, OF y piretroides *versus* un grupo control, esto en periodos de alta (8.6 U/gr Hb y 8.1 U/gr Hb) y baja exposición (10.3 U/gr Hb y 9.0 U/gr Hb, respectivamente). Contrariamente, Mecdad et al. (2011) observaron que fumigadores urbanos expuestos a insecticidas y fungicidas (15.52 U/L) tuvieron menor actividad GR con respecto a un grupo control (20.64 U/L).

Por otra parte, en estudios *in vitro* se ha observado que la actividad GR celular disminuye cuando se induce apoptosis con H₂O₂ (Kim et al., 2010). Esto pudiera explicar en parte, la asociación negativa que se encontró en este trabajo entre el contenido de MDA, un producto de lipoperoxidación y la actividad GR.

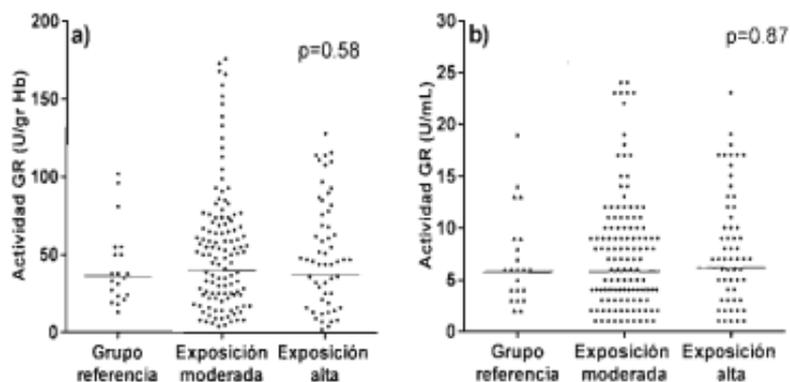


Figura 5. Actividad GR en sangre total (a) y en plasma (b) en la población de estudio. Las gráficas muestran el valor promedio en cada uno de los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

Tabla 10. Análisis bivariado modelando la actividad enzimática glutatión reductasa en sangre total

Enzima	Variable	β	p
GR U/gr Hb	Características de la población		
	Exposición a rayos X	-0.245	0.016
	Género	1.280	0.001
	Exposición y equipo de protección		
	Frecuencia de uso de equipo de protección	-0.511	0.035
	Litros de plaguicida usados al día	-0.004	0.044
	Uso actual de bendiocarb	-1.760	0.044
	Uso de guantes	-0.573	0.039
	Uso de lentes o mascarilla	-0.476	0.044
	Uso de mochila	-0.516	0.015
	Uso de motobomba	-0.409	0.047
	Uso de pañuelos o cubrebocas	-0.372	0.049
	Verter el plaguicidas con la mano	0.341	0.046
	Parámetros clínicos y bioquímicos		
Actividad CAT (U/gr Hb)	-0.008	0.030	
Fosfatasa alcalina	0.015	0.036	
Hematocrito	-0.096	0.046	
Hemoglobina	-0.247	0.048	

Tabla 11. Análisis bivariado modelando la actividad enzimática glutatión reductasa en plasma

Enzima	Variable	β	p
GR U/mL	Característica de la población		
	Actividad física	-0.033	0.049
	Exposición a rayos X	-0.083	0.029
	Exposición y equipo de protección		
	Uso actual de bendiocarb	-0.640	0.052
	Uso de mochila	-0.168	0.040
	Parámetros clínicos y bioquímicos		
	Actividad CAT (U/gr Hb)	-0.003	0.009
	Calcio	0.393	0.029
	Concentración de MDA (nmol/ μ L)	-0.234	0.043
	Fosfatasa alcalina	0.006	0.026

6.4 Niveles de MDA

En la figura 6 se presentan los resultados obtenidos de la concentración de MDA en la población de estudio. La media geométrica para la concentración de MDA en la población por grupo de exposición, fue de 0.97 nmol/ μ L en el grupo de referencia, 0.98 nmol/ μ L en el grupo de exposición moderada, y de 1.0 nmol/ μ L en el grupo de exposición alta. Con respecto al tiempo de exposición, la media geométrica de la concentración de MDA en los trabajadores cuya exposición era permanente fue de 1.1 nmol/ μ L y 0.9 nmol/ μ L en los participantes con exposición temporal ($p=0.02$). En la tabla 12 se presentan los datos del análisis de regresión logística modelando el contenido de MDA.

El MDA es uno de los biomarcadores más utilizados y confiables en la determinación de la lipoperoxidación como parte del estrés oxidativo su relevante determinación radica principalmente en su alta reactividad y toxicidad (Ayala et al., 2014). La concentración de MDA observados en este estudio, son similares a los descritos por Shadnia et al. (2005), en trabajadores de la formulación de plaguicidas OF, en el cual, no encontraron diferencia entre trabajadores en la formulación de plaguicidas (83.8 nmol/gr Hb) y el grupo control (79.9 nmol/gr Hb).

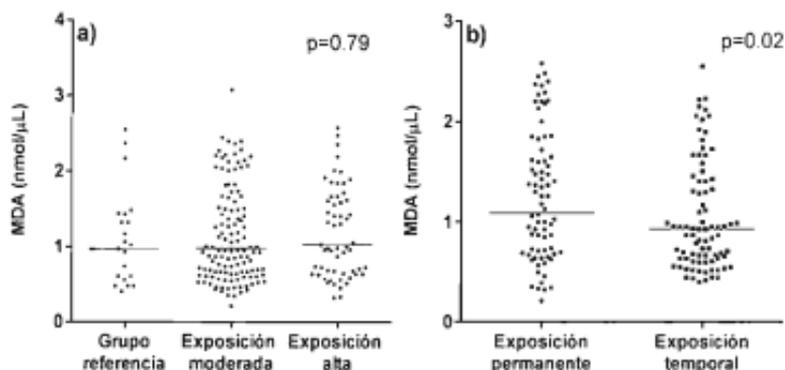


Figura 6. Niveles de MDA de acuerdo al grado de exposición a plaguicidas a) y tiempo trabajando b). Las gráficas muestran el valor promedio de cada uno de los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

Sin embargo, nuestros resultados difieren respecto a otros estudios realizados en poblaciones laboralmente expuestas a plaguicidas, en los que se reporta un aumento en la concentración de MDA comparado con el grupo controle (Muniz et al., 2008; Salvador et al., 2008; Rastogi et al., 2009; Ogut et al., 2011; Surajudeen et al., 2014). El MDA tiene potencial genotóxico que puede llegar a desarrollarse y por lo tanto, ser factor en el desarrollo de cáncer. Además, la toxicidad del MDA también puede referirse en la estabilidad cardiovascular, debido a su asociación con la oxidación de LDL (Del Rio et al., 2005).

En el análisis de regresión logística se encontró una asociación positiva de la concentración de MDA con el tiempo trabajando en el ámbito de la fumigación. Hasta donde es de nuestro conocimiento, no se ha descrito en la literatura lo que esto pudiera representar a corto, mediano o largo plazo, en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas, pero los datos sugieren la importancia de considerarse al evaluar la concentración en poblaciones con distinto tiempo de exposición.

Tabla 12. Análisis de regresión logística modelando los niveles de malondialdehído ($\leq 0.99\text{nmol}/\mu\text{L}$ / $>0.99\text{nmol}/\mu\text{L}$)*

Parámetro	Variable	OR	p
MDA dicotómica	Características de la población		
	Orina por la noche	1.828	0.031
	Consumo de aspirinas	2.301	0.048
	Exposición y equipo de protección		
	Trabajo permanente o temporal	0.469	0.022
	Biomarcadores bioquímicos		
	Actividad AChE (U/gr Hb)	1.108	0.021

* El corte fue realizado con base en la media geométrica de los niveles de malondialdehído.

6.5 Daño genético evaluado a través del ensayo cometa

En la figura 7, se muestran los datos de daño genético medidos a través del ensayo cometa en la población de estudio. Los resultados de la longitud de la cola de cometa muestran una media geométrica de $29.5 \mu\text{m}$ en el grupo de referencia, $28.5 \mu\text{m}$ en el grupo de exposición moderada y $32.7 \mu\text{m}$ en el grupo de exposición alta. En cuanto al momento de la cola de cometa, se observó una media geométrica de 7.5 en el grupo de referencia, 7.8 en el grupo de exposición moderada y 9.8 en el grupo de exposición alta. Con respecto al parámetro de momento de la cola de Olive, la media geométrica fue de 2.8 en el grupo de referencia, 2.9 en el grupo de exposición moderada y 3.4 en el grupo de exposición alta. Además, se observó que el grupo de referencia tuvo una media aritmética de 14.7% en el parámetro de %ADN, 15.1% en el grupo de exposición moderada y 16.3% en el grupo de exposición alta.

En tablas 13 y 16 se presentan los datos obtenidos para los análisis estadísticos bivariados de la longitud de la cola de cometa y %ADN respectivamente, mientras que en las tablas 14 y 15 se presentan los datos obtenidos para los análisis de regresión logística del momento de la cola y el momento de la cola de Olive respectivamente. De igual manera, en la tabla 17 se presenta un análisis multivariado del porcentaje de ADN.

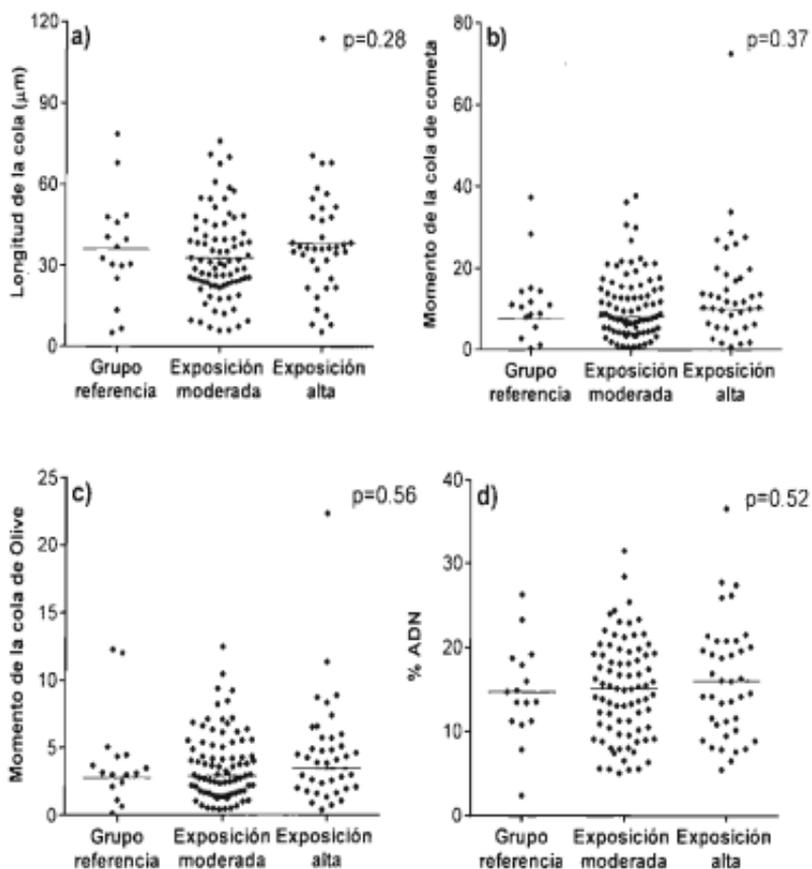


Figura 7. Longitud de la cola a), momento de la cola b), momento de la cola de Olive c), y porcentaje de ADN (%) d) en linfocitos de sangre periférica de la población de estudio. Las gráficas muestran el valor promedio de cada uno de los grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó mediante las pruebas de ANOVA y Kruskal-Wallis.

Tabla 13. Análisis bivariado modelando la longitud de la cola del cometa

Parámetro	Variable	β	p
Longitud de la cola	Características de la población		
	Género	-0.648	0.032
	Estado socioeconómico*	0.141	0.033
	Hábitos alimenticios		
	Consumo de ácido fólico	-1.733	0.021
	Exposición		
	Hábito de comer durante jornada laboral	0.740	0.038
	Uso actual temefos	0.841	0.007
	Uso actual clorpirifos	0.652	0.046
	Parámetros clínicos		
Creatinfosfoquinasa (CPK) (U/L)	0.002	0.040	

*Determinado mediante variables obtenidas por cuestionario.

Tabla 14. Análisis de regresión logística modelando el momento de la cola de cometa (≤ 8.31 / > 8.31)*

Parámetro	Variable	OR	p
Momento de la cola dicotómica	Características de la población		
	Estado socioeconómico**	1.341	0.005
	Parámetros clínicos y de investigación		
	Concentración de hemoglobina	1.599	0.028
	Colesterol (mg/dL)	0.990	0.031
Eosinófilos (%)	1.089	0.036	

* El corte fue realizado con base en la media geométrica poblacional de este parámetro.

**Determinado mediante variables obtenidas por cuestionario.

Tabla 15. Análisis de regresión logística modelando el momento de la cola de Olive (≤ 3.04 / > 3.04)*

Parámetro	Variable	OR	p
Momento Olive dicotómica	Exposición		
	Meses de trabajo (temporadas)	0.797	0.029
	Parámetros clínicos y de investigación		
	Actividad glutatión reductasa (U/mL)	1.090	0.012
	Actividad glutatión reductasa (U/gr Hb)	1.011	0.030
	Calcio (mg/dL)	2.982	0.030
	Creatinina (mg/dL)	9.207	0.044
	Concentración de hemoglobina	1.562	0.035
	Plaquetas (mm ³)	0.999	0.040

* El corte fue realizado con base en la media geométrica poblacional de este parámetro.

Tabla 16. Análisis bivariado modelando el porcentaje de ADN

Parámetro	Variable	β	p
%ADN	Características de la población		
	Estado socioeconómico*	0.542	0.037
	Exposición		
	Comidas en el trabajo	2.958	0.030
	Hábito de comer durante jornada laboral	-0.567	0.046
	Uso actual clorpirifos	2.578	0.050
	Uso actual temefos	3.350	0.007
	Parámetros clínicos y de investigación		
	Actividad catalasa (U/gr Hb)	-0.029	0.010
	Creatinina (mg/dL)	2.400	0.029

*Determinado mediante variables obtenidas por cuestionario.

Tabla 17. Análisis multivariado modelando el porcentaje de ADN

Parámetro	Variable	β	p
%ADN	Actividad catalasa (U/gr Hb)	-0.034	0.061
	Hábito de comer mientras fumiga	3.551	0.005
	Uso actual temefos	6.407	0.001

El parámetro de la longitud de la cola de cometa es considerado sensible a exposiciones bajas de plaguicidas (Moretti et al., 2000). Los resultados de este estudio con respecto a la longitud de la cola de cometa, son similares a lo reportado por Moretti et al. (2000) en una población de agricultores expuestos a plaguicidas (31.9 μm) con respecto a controles (28.6 μm). Asimismo, Piperakis et al. (2003) reportaron no haber encontrado diferencia significativa en una población de fumigadores de invernadero en Grecia. Sin embargo, Kisby et al. (2009) encontraron un aumento de hasta 3 veces la longitud de la cola de cometa en aplicadores y agricultores expuestos a OF con respecto a controles. Esto pudiera deberse al tiempo y escenario de exposición entre las diferentes poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas. Los análisis bivariados muestran asociaciones de la longitud de la cola de cometa con el consumo de ácido fólico y el uso de plaguicidas OF, concretamente temefos y clorpirifos. A pesar de no tener una diferencia significativa, se ha observado que el uso de clorpirifos aumenta la fragmentación del material genético (Ojha et al., 2011; Li et al., 2015), por lo que su asociación en este estudio es de gran importancia.

Por otro lado, el momento de la cola de cometa, incorpora la cantidad de daño al ADN en la cola y la distancia que migra (Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2002). En este sentido nuestros resultados concuerdan con los reportados por Moretti et al. (2000) en una población de agricultores expuestos a plaguicidas comparado con los controles (3.3 y 2.5, respectivamente). Contrario a lo reportado, Singh et al. (2011) encontraron un aumento en este parámetro en trabajadores ocupacionalmente expuestos a OF (14.5) con respecto a un grupo control (6.42). Mientras que el análisis de regresión logística sugiere asociaciones con variables de tipo clínico como la concentración de hemoglobina, colesterol y el porcentaje de eosinófilos. Algunas de las limitantes que se tienen en el caso de este ensayo es que muchos de los artículos referidos en la literatura no evalúan los mismos parámetros, por lo que es complicado hacer una correcta comparación de resultados. Además, la frecuencia y tiempo de exposición es distinta en cada población evaluada.

El momento de la cola de Olive combina la longitud del cometa y la intensidad del brillo del cometa (Dhawan et al., 2009). Aún son escasos los estudios en donde se evalúa este parámetro para medir el daño producido al material genético. Los resultados de este estudio no sugieren diferencias con relación a la exposición. Sin embargo, Singh-Yadav et al. (2011) encontraron un aumento de este parámetro en agricultores expuestos a una mezcla de plaguicidas con (15.6) con respecto a su grupo control (1.8). En el análisis de regresión logística, se encontraron asociaciones con el tiempo de trabajo en meses, así como, con la actividad de la enzima GR, tanto en sangre total como en plasma. Lo anterior pudiera sugerir la participación de esta enzima en la protección de la integridad del ADN. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para comprobar dicha hipótesis.

Finalmente, el %ADN en la cola del cometa observado en este estudio, es similar a los reportados por Moretti et al. (2000), en una población de agricultores expuestos a plaguicidas (13.3%) comparado con un grupo control (12.6%), así también Piperakis et al. (2009) no encontraron diferencia en el daño al ADN entre los grupos de trabajadores de invernadero expuestos a plaguicidas comparados con un grupo de individuos no expuestos. Por otro lado, Singh et al. (2011) observaron un aumento significativo en este parámetro en los agricultores expuestos a una mezcla de plaguicidas (60.4%) con respecto a su grupo control (31.9%).

Por otro lado, en los análisis bivariados de %ADN, se encontraron asociaciones con el uso actual de temefos, clorpirifos y el hábito de comer durante las jornadas de trabajo. Así también, se encontró una asociación inversa con la actividad de la enzima antioxidante CAT, lo que sugiere la participación de esta enzima en el cuidado de la integridad del ADN.

En el análisis multivariado se observó una estrecha correlación con el uso actual del plaguicida temefos, así como con hábitos que tuvieran los fumigadores a la hora de estar en contacto con los plaguicidas, tales como el comer durante sus jornadas laborales, o el manipular de manera directa el plaguicida. Estos parámetros se asociaron positivamente, sugiriendo que un mayor uso y una mala manipulación de este temefos pueden aumentar el %ADN, es decir, el daño genético. También se

observó una asociación inversamente proporcional de la actividad enzimática CAT, lo que sugeriría la posibilidad de que ésta funcione como un mecanismo protector en la integridad del ADN.

En la tabla 18 se muestra el análisis de correlación entre las actividades de enzimas antioxidantes, contenido de MDA y parámetros de daño genético. En este sentido, en el grupo de exposición moderada, se encontró una correlación positiva entre la actividad de la enzima GPx y los niveles de MDA, así como también marginalmente significativa con la actividad GPx y el parámetro de momento de la cola de cometa. Por otra parte, en el grupo de alta exposición se observó una correlación negativa entre la actividad CAT y la actividad GR y la actividad CAT y el %ADN. Asimismo, se observó una correlación positiva entre el contenido de MDA y los parámetros de genotoxicidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren una participación importante de las enzimas antioxidantes dependiente de la exposición, para la protección del daño al ADN causado por la exposición ocupacional a plaguicidas.

Tabla 18. Análisis de correlación entre las actividades de enzimas antioxidantes, niveles de malondialdehído y parámetros de daño genético

Parámetros	BUCHE (U/L)	ACHE (U/gr Hb)	CAT (U/gr Hb)	GR (U/gr Hb)	SOD (U/mL)	GPx (U/mL)	MDA (nmol/μL)	Longitud cola cometa (μm)	Momento cola de cometa	Momento de la cola de Olive	%ADN
Grupo de referencia											
BUCHE (U/L)	0.17	--									
ACHE (U/gr Hb)	-0.17	-0.08									
CAT (U/gr Hb)	-0.01	-0.18	-0.53**								
GR (U/gr Hb)	0.26	0.15	-0.32	0.30	--						
SOD (U/mL)	0.16	-0.10	0.11	0.13	0.38	--					
GPx (U/mL)	0.17	0.15	0.19	-0.37	0.13	0.10	--				
MDA (nmol/μL)	0.42*	-0.35	0.12	-0.03	-0.02	0.01	-0.35	--			
Longitud cola (μm)	0.43*	-0.20	0.08	-0.22	-0.05	-0.05	-0.26	0.95***	--		
Momento cola	0.31	-0.28	0.10	-0.29	-0.04	-0.05	-0.26	0.91***	0.97***	--	
Momento de la cola de Olive	0.38	-0.08	0.04	-0.17	-0.04	0.11	-0.40	0.84***	0.88***	0.86***	--
%ADN											
Exposición moderada											
BUCHE (U/L)	-0.07	--									
ACHE (U/gr Hb)	0.10	0.10	--								
CAT (U/gr Hb)	-0.11	-0.03	-0.01	0.02	--						
GR (U/gr Hb)	-0.05	0.09	0.05	0.02	0.01	--					
SOD (U/mL)	0.18*	0.01	-0.01	-0.07	-0.01	0.20**	--				
GPx (U/mL)	-0.03	0.28***	-0.07	-0.09	-0.01	0.15	0.05	--			
MDA (nmol/μL)	-0.01	-0.07	-0.01	0.15	-0.03	0.17	0.02	0.94***	--		
Longitud cola (μm)	-0.02	-0.07	-0.04	0.11	-0.08	0.21*	0.05	0.90***	0.97***	--	
Momento cola	0.01	-0.03	-0.01	0.16	-0.12	0.18	0.04	0.81***	0.90***	0.92***	--
Momento de la cola de Olive	-0.01	-0.01	-0.17	0.11	-0.07	0.18	0.04				
%ADN											
Exposición alta											
BUCHE (U/L)	0.05	--									
ACHE (U/gr Hb)	0.18	0.32	--								
CAT (U/gr Hb)	-0.04	-0.02	-0.29**								
GR (U/gr Hb)	-0.01	0.25*	-0.07	0.12	--						
SOD (U/mL)	-0.08	-0.11	0.01	0.17	0.12	--					
GPx (U/mL)	-0.05	0.10	-0.04	-0.16	-0.09	-0.32**	--				
MDA (nmol/μL)	-0.07	0.02	-0.30*	0.08	0.20	0.07	0.41**	--			
Longitud cola (μm)	-0.08	0.13	-0.30*	0.04	0.23	-0.08	0.54***	0.94***	--		
Momento cola	-0.02	0.15	-0.23	0.06	0.28*	-0.05	0.85***	0.87***	0.87***	--	
Momento de la cola de Olive	-0.02	0.15	-0.23	0.06	0.28*	-0.05	0.85***	0.88***	0.88***	0.88***	--
%ADN	-0.05	0.01	-0.35**	0.17	0.18	0.04	0.31*				

*p<0.1; **p<0.05; ***p<0.01

7 CONCLUSIONES

1. No se encontraron diferencias en la actividad AChE entre los grupos de estudio, sin embargo, el 12,5% de la población mostraron valores por debajo de los valores mínimos consideramos como normales.
2. Las enzimas antioxidantes CAT y SOD mostraron una disminución marginalmente significativa en el grupo de alta exposición con respecto al de referencia, así como una asociación con algunos plaguicidas de uso actual.
3. Las enzimas GPx y GR no fueron diferentes estadísticamente en los grupos de estudio, sin embargo, la enzima GPx mostró una asociación con el género y el uso pasado de los plaguicidas K-otrin y bendiocarb.
4. Se encontró una asociación entre la concentración de MDA y el tiempo laborando con plaguicidas. Los trabajadores que laboran de manera permanente presentaron una mayor concentración de MDA.
5. Tanto la longitud de la cola de cometa, como el porcentaje de ADN se asociaron con el uso actual de los plaguicidas OF temefos y clorpirifos.
6. El porcentaje de ADN mostró una asociación positiva con el uso del plaguicida temefos, así como con el hábito de manipular el plaguicida con la mano y una asociación inversa con la actividad enzimática CAT.

8 PERSPECTIVAS

- Aumentar el tamaño de muestra del grupo de referencia a fin de poder realizar análisis estadísticos más robustos.
- Evaluar otros marcadores novedosos como peroxiredoxina, hidroxinonales e isoprostanos, para contar con un escenario más completo del estrés oxidativo.
- Complementar el estudio con una batería de biomarcadores de genotoxicidad que permita evaluar diferentes mecanismos de toxicidad de los plaguicidas.

9 BIBLIOGRAFÍA

Abdalla M S H., Saad-Hussein A., Ibrahim K S., El-mezayen H A., Osman N F A. (2012). Effects of smoking on the oxidant/antioxidant balance and the blood lipids in pesticide sprayers. *Toxicology and Industrial Health* (31): 173-178.

Aebi H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods in enzymology* (105): 121-126.

Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collin P Lomri A. (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* (74): 324-329.

Alavanja M C R., Ross M K., Bonner M R. (2013). Increased cancer burden among pesticide applicators and others due to pesticide exposure. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* (63): 120-142.

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

Antolovich M., Prenzler P D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. (2001). Methods for testing antioxidant activity. *The royal society of chemistry, Analyst* (127): 183-198.

Arencibia D., Rosario L. (2003). Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*; *Revista de toxicología en línea* 24-41.

Aroonvilairat S., Kespichayawattana W., Sornprachum T., Chaisuriya P., Siwadune T., Ratanabanangkoon K. (2015). Effects of pesticide exposure on immunological, hematological and biochemical parameters in Thai Orchid farmers – A cross-sectional study. *Int. J. Environ. Res. Public Health* (12): 5846-5861.

Ayala A., Muñoz M F., Argüelles S. (2014). Lipid peroxidation: Production, Metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1-31.

Benítez D E. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed* (25): 1-8.

Bernal-Hernández Y Y., Medina-Díaz I M., Barrón-Vivanco B S., Robledo-Marengo M L., Girón-Pérez M I., Pérez-Herrera N E., Quintanilla-Vega B., Cerda-Flores R., Rojas-García A E. (2014). Paraoxonase 1 and its relationship with pesticide biomarkers in indigenous mexican farmworkers; *Journal of occupational and environmental medicine* (56): 1-10.

Bukowska B., Chajdys A., Duda W., Duchnowicz P. (2000). Catalase activity in human erythrocytes: effect of phenoxyherbicides and their metabolites. *Cell Biology International* (24): 705-711.

Carvalho F P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy* (9): 685-692.

Colovic M B., Krstic D Z., Lazarevic-Pasti T D., Bondzic A M., Vasic V M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* (11): 315-335.

Corsini E., Sokooti M., Galli C L., Moretto A., Colosio C. (2013). Pesticide induced immunotoxicity in humans: A comprehensive review of the existing evidence. *Toxicology* (307): 123-135.

Costa L. (2008). Toxic Effects of Pesticides. In: *Toxicology The basic science of poisons*, 7th ed. Curtis D. Klaassen, pp.883-930.

Day B J. (2009). Catalase and glutathione peroxidase mimics. *Biochemical Pharmacology* (77): 285-296.

Del Rio D., Stewart A J., Pellegrini N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* (15): 316-328.



Devasagayam T P A., Tilak J C., Boloor K K., Sane K S., Ghaskadbi S S., Lele R D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of the association of physicians of India* (52): 794-804.

Dhawan A., Anderson D. (2009). *The Comet Assay in Toxicology*, RSC Publishing, Cap. 17 p. 428.

Dhouib I B., Annabi A., Jallouli M., Marzouki S., Gharbi N., Elfazaa S., Lasram M M. (2016). Carbamates pesticides induced immunotoxicity and carcinogenicity in human: A review. *Journal of Applied Biomedicine* (14): 85-90.

Dianzani M., Barrera G. (2008). Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. En: Álvarez. S: Evelson. P. (ed), *Free Radical Pathophysiology*. 19-38.

Díaz, A. (2002). La estructura de las catalasas. *REB* (22): 76-84.

Ding G., Fu M., Qin Q., Lewis W., Kim H W., Fukai T., Bacanamwo M., Chen Y E., Schneider M D., Mangelsdorf D J., Evans R M., Yang Q. (2007). Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage. *Cardiovasc Res* (76): 269-279.

Ellman G L., Courtney K D., Andres V., Featherstone R M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* (7): 88-95.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estadísticas (consultado en julio 2016: <http://faostat3.fao.org/download/R/RP/S>)

Flohé L., Wingender E., Brigelius-Flohé R. (1997). Regulation of glutathione peroxidases. *Oxidative stress and signal transduction ed. Henry Jay Forman and Enrique Cardenas*. 415-440.

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): 246-248.

Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. (2002). Assessment of Genome Damage in a Population of Croatian Workers Employed in Pesticide Production by Chromosomal Aberration Analysis, Micronucleous Assay and Comet Assay. *Journal of Applied Toxicology*. (22): 249-255.

González-Arias C., Robledo-Marengo M., Medina-Díaz I M., Velázquez-Fernández J B., Girón-Pérez M I., Quintanilla-Vega B., Ostrosky-Wegman P., Pérez-Herrera N E., Rojas-García A E. (2010). Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México; *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 26 (26): 221-228.

Grover P., Danadevi K., Mahboob M., Rozati R., Saleha Banu B., Rahman M F. (2003). Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay; *Mutagenesis* 18 (18): 205-205.

Hargreaves A J. (2012): *Neurodegenerations induced by organophosphorous compounds*; Landes Bioscience and Springer Science+Business Media: 189-204.

Hernández A F., Lacasaña M., Gil F., Rodríguez-Barranco M., Pla A., López-Guarnido O. (2013). Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environmental interaction perspective. *Toxicology* (307): 95-102.

INECC. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (consultado en enero 2016: <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/768-sqre-plaguicidas>).

Jerez A H., Martínez A P. (2007). Toxicidad de los plaguicidas; Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas. Manual para el sanitario. Vigilancia epidemiológica: 1-16.

Jo S., Yang C., Miao Q., Marzee M., Wasik M A., Lu P., Wang L. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor γ promotes lymphocyte survival through its actions on cellular metabolic activities. *The Journal of Immunology* (177): 3737-3745.

Kaminski N E., Faubert Kaplan B L., Holsapple M P. (2008). Toxic Effects of Pesticides. In: *Toxicology The basic science of poisons*, 7th ed. Curtis D. Klaassen, pp.527.

- Karademir C B., Ozden S., Alpertunga B. (2007). Effects of trichlorfon on malondialdehyde and antioxidant system in human erythrocytes. *Toxicology in Vitro* (21): 1538-1544.
- Karam M., Ramírez G., Bustamante P., Galván J. (2004). Plaguicidas y salud de la población; *Ciencia ergo sun* 11(11): 246-254.
- Kawashima K., Fujii T. (2000). Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology & Therapeutics* (86): 29-48.
- Kim S J., Jung H J., Hyun D H., Park E H., Kim Y M., Lim Chang J. (2010). Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells. *Biochimie* (92): 927-932.
- Kisby G E., Muniz J F., Scherer J., Lasarev M R., Koshy M., Kow Y W., McCauley, L. (2009). Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *Journal of Agromedicine* (14): 206-214.
- Kodytková J., Vávrová L., Koclk M., Zák A. (2014). Human Catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biologica (Praha)* (60): 153-167.
- Kono Y., Fridovich I. (1982). Superoxide radical inhibits Catalase. *The Journal of Biological Chemistry* 257(10): 5751-5754.
- Koureas M., Tsakalof A., Tzatzarakis M., Vakonaki E., Tsatsakis A., Hadjichristodoulou C. (2014). Biomonitoring of organophosphate exposure of pesticide sprayers and comparison of exposure levels with other population groups in Thessaly (Greece). *Occup. Environ Med* (71): 126-133.
- Lagouge M., Larsson N G. (2013). The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *Journal of internal Medicine* (273): 529-543.
- Lepetsos P., Papavaassiliou A G. (2016). ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1862 576-591.

Li D., Huang Q., Lu M., Zhang L., Yang Z., Zong M., Tao L. (2015). The organophosphate insecticide chlorpyrifos confers its genotoxic effects by inducing DNA damage and cell apoptosis. *Chemosphere* (135): 387-393.

Li H Y., Wu S Y., Ma Q., Shi N. (2011). The pesticide deltamethrin increases free radical production and promotes nuclear translocation of the stress response transcription factor Nrf2 in rat brain; *Toxicology and Industrial Health* (27): 579-590.

Limón-Pacheco J., Gonsebatt M E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* (674): 137-147.

López G O. (2005). Influencia de la exposición crónica a plaguicidas sobre diversos marcadores bioquímicos (esterasas y enzimas antioxidantes) en trabajadores de invernadero de la zona oriental de Andalucía. Tesis Doctoral Universidad de Granada. Facultad de Medicina. Departamento de medicina legal, toxicología y psiquiatría.

López O., Hernández A F., Rodrigo L., Gil F., Pena G., Serrano J L., Parrón T., Villanueva E., Pla A. (2007). Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology Letters* (171): 146-153.

Lu X T., Ma Y., Wang C., Zhang X F., Jin D Q., Huang C J. (2012). Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *Journal of Environmental Science and Health* (47): 445-454.

Lubos E., Loscalzo J., Handy D E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling* (15): 1957-1997.

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

Maroni M., Colosio C., Ferioli A., Fait A. (2000). Biological monitoring of pesticide exposure: a review; *Toxicol* (143): 5-118.

Martínez G R., Loureiro A P M., Marques S A., Miyamoto S., Yamaguchi L F., Onuki J., Almeida E A., Garcia C C M., Barbosa L F., Medeiros M H G., Mascio P. (2003). Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research* (544): 115-127.

Matés J M., (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* (153): 83-104.

Mathew P., Jose A., Alex R G., Mohan V R. (2015). Chronic pesticide exposure: Health effects among pesticide sprayers in Southern India. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine* (19): 95-101.

Mecdad A A., Ahmed M H., ElHalwagy M E A., Afify M M M. (2011). A study on oxidative stress biomarkers and immunomodulatory effects of pesticides in pesticides-sprayers. *Egyptian Journal of Forensic Sciences* (1): 93-98.

Miao L., St Clair D. (2009). Regulation of Superoxide Dismutase genes: Implications in diseases. *Free Radic Biol Med* (47): 344-356.

Min J Y., Lim S O., Jung G. (2010). Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. *FEBS Lett.* (584): 2427-2432.

Miranda-Contreras L., Gómez-Pérez R., Rojas G., Cruz I., Berrueta L., Salmen S., Colmenares M., Barreto S., Balza A., Zavala L., Morales Y., Molina Y., Valeri L., Contreras C A., Osuna J. (2013). Occupational exposure to Organophosphate and carbamate pesticides affects sperms chromatin integrity and reproductive hormone levels among Venezuelan farm workers. *J Occup Health* (55): 195-203.

Moretti M, Villarini M, Scasselati-Sforzolini G, Pasquini R. (2000). Pesticide- Induced Primary DNA Damage in Peripheral Blood Leukocytes of Farm Workers Evaluated by the Computerized 'Comet' Assay. *Biomarkers*. 5(3): 192-204.

- Mostafalou S., Abdollahi M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology* (268): 157-177.
- Muniz J F., McCauley L., Scherer J., Lasarev M., Koshy M., Kow Y W., Nazar-Stewart V., Kisby G E (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: A pilot study. *Toxicology and Applied Pharmacology* (227): 97-107.
- Murussi C., Horn R C., Santi A., Clasen B E., Reis G., Souza D., Woutheres J B., Manfio C E., Loro V L. (2014). Changes in oxidative markers, endogenous antioxidants and activity of the enzyme acetylcholinesterase in farmers exposed to agricultural pesticides – a pilot study. *Ciencia Rural, Santa Maria* (44): 1186-1193.
- Naravaneni R., Jamil K. (2007): Determination of AChE levels and genotoxic effects in farmers occupationally exposed to pesticides. *Human & Experimental Toxicology* (26): 723-731.
- Navarro-Alarcon M., Cabrera-Vique C. (2008). Selenium in food and the human body: A review. *Science of the Total Environment* (400): 115-141.
- Oates N., Pamphlett R. (2007). An epigenetic analysis of SOD1 and VEGF in ALS. *Amyotroph Lateral Scler* (8): 83-86.
- Ogut S., Gültekin F., Kisioglu A N., Kucukoner E. (2011). Oxidative stress in the blood of farm workers following intensive pesticide exposure; *Toxicology and Industrial Health* (27): 820-825.
- Ogut S., Küçüköner E., Gültekin F. (2013). The effects of pesticides on greenhouse workers and their produced products. *Toxicological & Environmental Chemistry* (94): 403-410.
- Ojha A., YAdvanshi S K., Pant S C., Lomash V., Srivastava N. (2011). Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and mixture, in rat tissues. *Environmental Toxicology* 1-10.

OMS. (2006). Organización Mundial de la Salud (consultado en: julio de 2016 <http://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/es/>)

OMS. (2009). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification (consultado en: julio de 2016 http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf)

Ortiz I., Avila-Chávez A., Torres L. G. (2014). Plaguicidas en México: usos, riesgos y marco regulatorio. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* (4): 26-46.

Pilger A., Rüdiger H. W. (2006). 8-Hidroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health* (80): 1-15.

Piperakis S. M., Petrakou E., Tsilimigaki S., Sagnou M., Monogiudis E., Haniotakis G., Karkaseli H., Sarikaki E. (2003). Biomonitoring With the Comet Assay of Greek Greenhouse Workers Exposed to Pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (41): 104-110.

Piperakis S. M., Kontogianni K., Siffel C., Piperakis M. M. (2005). Measuring of Effects of Pesticides on Occupationally Exposed Humans with the comet assay. *Environmental Toxicology* 355-359.

Piperakis S. M., Kontogianni K., Karanastasi G., Iakovidou-Kritsi Z., Cebulska-Wasilewska A., Piperakis M. M. (2009). Investigation of the genotoxic effect of pesticides on greenhouse workers lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (50): 121-126.

Pompella Á., Visvikis A., Paolicchi A., De Tata V., Casini A. F. (2003). The changing faces of glutathione, a celular protagonist. *Biochemical Pharmacology* (66): 1499-1503.

Quinto J O. (1999). NTP 513: Plaguicidas organofosforados (I): aspectos generales y Toxicocinética. Ministerio de trabajo y asuntos sociales España, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Rahal A., Kumar A., Singh V., Yadav B., Tiwari R., Chakraborty S., Dhama K. (2014). Oxidative stress, prooxidants and antioxidants: the interplay. *BioMed Research International* 1-19.

Ramírez J A., Lacasaña M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* (4): 67-75.

Ranjbar A., Pasalar P., Abdollahi M. (2002). Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorous pesticide manufacturing workers. *Human & Experimental Toxicology* (21): 179-182.

Ranjbar A., Solhi H., Mashayekhi F J., Susanabdi A., Rezaie A., Abdollahi M. (2005). Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides: a case control study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (20): 88-91.

Rastogi S K., Satyanarayan P V V., Ravishankar D., Tripathi S. (2009). A study on oxidative stress and antioxidant status of agricultural workers exposed to organophosphorus insecticides during spraying. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine* (13): 131-134.

Rendón-von Osten J., Epomex C., Tinoco-Ojanguren R., Soares A M., Guilhermino L. (2004). Effect of pesticide exposure on acetylcholinesterase activity in subsistence farmers from Campeche, Mexico. *Arch Environ Health* (59): 418-425.

Repetto M., Semprine J., Boveris A. (2012). Lipid peroxidation: Chemical mechanism, biological implications and analytical determination.

Réus G Z., Valvassori S S., Nuernberg H., Comim C M., Stringari B., Padilha P T., Leffa D D., Tavares P., Dagostim G., Paula M M S., Andrade V M., Quevedo J. (2008). DNA damage after acute and chronic treatment with malathion in rats. *J Agric Food Chem* (56): 7560-7565.

Rose R L., Hodgson E. (2004). Chemical and physiological influences on xenobiotic metabolism. A Textbook of Modern Toxicology. Third Edition: 163-202.

Saeidnia S., Abdollahi M. (2013). Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. Toxicology and Applied Pharmacology (273): 442-455.

Saillenfait A M., Ndiaye D., Sabaté J P. (2015). Pyrethroids: Exposure and health effects – An update. International Journal of Hygiene and Environmental Health (218): 281-292.

Salvador M., Bordin D L., Andrezza A C., Da Silva J., Henriques J A P., Erdtmann B. (2008). Determination of oxidative stress markers and serum cholinesterase among pesticide sprayers in southern Brazil. Toxicological & Environmental Chemistry (90): 809-814.

Sánchez-Guerra M., Pérez-Herrera N., Quintanilla-Vega B. (2011). Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. Toxicology Mechanisms and Methods (21): 681-691.

Santi A., Menezes C F., Duarte M M., Leitemperger J., Lópes T., Loro V L. (2011). Oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (*in vitro*). Interdiscip Toxicol (4): 149-153.

Shadnia S., Azizi E., Hosseini R., Khoei S., Fouladdel S., Pajoumand A., Jalali N., Abdollahi M. (2005). Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. Human & Experimental Toxicology (24): 439-445.

Sharma R K., Upadhyay G., Siddiqi N J., Sharma B. (2013). Pesticides-induced biochemical alterations in occupational North Indian suburban population. Human and Experimental Toxicology (32): 1213-1227.

Silveira M I., Amarillas V., Aldana M., Zuno F. (2011). Valoración de Riesgo de exposición a insecticidas organofosforados en adultos del sexo masculino en Sonora, México. *Ciencia@UAQ* (4) 70-81.

Simoniello M F., Kleinsorge E C., Scagnetti J A., Scagnetti J A., Mastandrea C., Grigolato R A., Paonessa A M., Carballo M A. (2010). Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers* (15): 52-60.

SINAVE. (2013). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información (35).

Singh S., Kumar V., Thakura S., Banerjee B., Chandnac S., Singh-Rautelaa R., Sunder-Grovera S., Singh-Rawata D., Tazeen-Pashaa S., Kumar-Jaind S., Ichhpujania R., Raia A. (2011). DNA Damage and Cholinesterase Activity in Occupational Workers Exposed to Pesticides. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (31): 278-285.

Singh-Yadav A, Sehrawat G. (2011). Evaluation of Genetic Damage in Farmers Exposed to Pesticide Mixtures. *International Journal of Human Genetics* (11): 105-109.

Singleton S T., Lein P J., Dadson O A., McGarrigle B P., Farahat F M., Farahat T., Bonner M R., Fenske R A., Galvin, K., Lasarev M R., Anger W K., Rohlman D S., Olson J R. (2015). Longitudinal assessment of occupational exposure to the organophosphorous insecticides chlorpyrifos and profenofos in Egyptian cotton field workers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (218): 203-211.

Soderlund D M. (2010). Toxicology and mode of action of pyrethroid insecticides. In: *Hayes' Handbook of pesticides toxicology Volume 1 & 2*, 3th ed. Robert Krieger pp 1666-1686.

Steele L., Lockridge O., Gerkovich M M., Cook M R., Sastre A. (2015). Buryrylcholinesterase genotype and enzyme activity in relation to Gulf War illness: preliminary evidence of gene-exposure interaction from a case-control study of 1911 Gulf War veterans. *Environmental Health* (14): 1-10.

- Surajudeen Y A., Sheu R K., Ayojulehin K M., Olatunbosun A G. (2014). Oxidative stress indices in Nigerian pesticide applicators and farmers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* (4): 37-41.
- Suybros N., Thetkathuek A., Meepradit P., Danielli W., Jaidee W. (2012). Factors affecting cholinesterase level among insecticide-exposed vegetable farmers in Prek Balatchheng, Cambodia: A case study. *Journal of Science, Technology and Humanities* (12): 89-97.
- Tice R R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E.; Ryu J C., Sasaki Y F. (2000). Single cell gel/Comet assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* (35): 206-221.
- Tilman D., Cassman K G., Matson P A., Naylor R., Polasky S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practice. *Nature* (418): 671-676.
- Tinoco-Ojanguden R., Halperin D C. (1998). Poverty, production and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase via occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Arch Environ Health* (53): 29-35.
- Vidyasagar J., Karunakar N., Reddy M S., Rajnarayana K., Surender T., Krishna D R. (2004). Oxidative stress and antioxidant status in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Indian J Pharmacol* (36): 76-79.
- Wafa T., Nadia K., Amel N., Ikbal C., Insaf T., Asma K., Abdel Hedi M., Mohamed H. (2013). Oxidative stress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to pesticides. *Journal of Environmental Science and Health Part B* (48): 1058-1069.
- Winterbourn C C. (2014). Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radical Biology and Medicine*. 1-7.

Zeljezic D., Lucic Vrdoljak A., Radic B., Fuchs N., Berend S., Orescanin V., Kopjar N. (2007). Comparative evaluation of acetylcholinesterase status and genome damage in blood cells of industrial workers exposed to carbofuran. *Food and Chemical Toxicology* (45): 2488-2498.

Zhao Y., Oberley T D., Chaiswing L., Lin S M., Epstein C J., Huang T T., St Clair D. (2002). Manganese superoxide dismutase deficiency enhances cell turnover via tumor promoter-induced alterations in AP-1 and p53-mediated pathway in a skin cancer model. *Oncogene* (21): 3836-3846.