

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS AGROPECUARIAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

**DETERMINACIÓN DEL DAÑO GENÉTICO Y DE LA EXPRESIÓN
GÉNICA EN INDIVIDUOS EXPUESTOS A PLAGUICIDAS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO EN
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B Marisol Fuentes Reyes

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

CO-DIRECTORA:

Dra. María de Lourdes Robledo Marengo

Tepic, Nayarit; julio de 2011



UAN

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
LABORATORIO DE CONTAMINACIÓN Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL



Tepec, Nayarit, 5 de julio de 2011

DR. JUAN DIEGO GARCÍA PAREDES
CORDINADOR DEL POSGRADO CBAP
PRESENTE

Por este conducto nos permitimos comunicarle que la tesis de la estudiante de maestría **Marisol Fuentes Reyes** titulada **"Determinación del daño genético y de la expresión génica en individuos expuestos a plaguicidas"**, ha sido revisada y aprobada en contenido y formato. Por lo que consideramos que la estudiante puede continuar con los trámites para solicitar fecha de examen de grado.

Sin más por el momento reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García
Dra. Maria de Lourdes Robledo Marengo
Dra. Irma Martha Medina Díaz
Dr. Manuel Iván Girón Pérez
M. en C. Briscia Socorro Barrón Vivanco

c.c.p. Archivo



Ciudad de la Cultura "Amado Nervo"
Edificio CEMIC 03, Tepec, Nayarit
CP. 63155 Tel. (311) 2118800 ext. 8919
Fax 2118816



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS

CBAP/165/11

Xalisco, Nayarit., 05 de julio de 2011



Ing. Alfredo González Jáuregui
Director de Administración Escolar
Presente.

Con base al oficio de fecha 05 de julio de 2011, enviado por los CC. Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, Dra. María de Lourdes Robledo Marengo, Dra. Irma Martha Medina Díaz, Dr. Manuel Iván Girón Pérez y M.C. Briscia Socorro Barrón Vivanco, donde se nos indica que el trabajo de tesis titulado "Determinación del daño genético y de la expresión génica en individuos expuestos a plaguicidas," cumple con lo establecido en forma y contenido, debido a que ha cumplido con los demás requisitos que pide el Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nayarit, se autoriza a la C. Marisol Fuentes Reyes, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Maestría.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

"Por lo Nuestro a lo Universitario"



Dr. J. Diego García Paredes
Coordinador del Posgrado

C.c.p.-Minutario.

- C.c.p.-Expediente.

ref.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental, de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la tutoría de las doctoras Aurora Elizabeth Rojas García y María de Lourdes Robledo Marengo, y con financiamiento de FOMIX M0013-2008-2-92435

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, mi más sincero agradecimiento por cada uno de los consejos y conocimientos tanto académicos como personales, quien me ha enseñado a salir adelante ante toda circunstancia, además le agradezco por haberme tendido la mano en todo momento, por contribuir en mi formación académica, por la confianza depositada en mí. Gracias, es un privilegio tener la oportunidad de trabajar con una gran investigadora como Ud. y sobretodo por su invaluable amistad.

A la Dra. Lourdes Robledo Marengo por su gran amistad y sobre todo por sus buenos consejos y conocimientos compartidos, los cuales me han enseñado demasiado en este trayecto. Gracias Dra, por ser una persona a la cual admiro en todos los sentidos y por ser una persona tan optimista y con gran entusiasmo.

A mis Directoras de tesis por todo su apoyo durante la realización de este trabajo, muchas gracias es un privilegio trabajar con uds y sobretodo considerarlas como a mi segunda familia.

A la Dra. Irma Martha Medina Díaz por el apoyo brindado, por sus valiosos comentarios y sugerencias que le dieron mayor solidez al presente estudio.

A la Dra. Briscia del Socorro Barrón Vivanco por ser una gran persona y compartir sus conocimientos y ayuda durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Manuel Iván Girón Pérez por sus aportaciones y sugerencias para la mejora del presente trabajo.

A la Dra. Patricia Ostrosky por haberme abierto las puertas de su laboratorio para la capacitación de la técnica de Micronúcleos por bloqueo de citocinesis .

A la Q.F.B Monserrat Sordo por haberme capacitado en la técnica de Micronúcleos por bloqueo de citocinesis y por su gran amabilidad y ayuda durante la realización del presente trabajo, gracias por tu amistad.

A Mayra y Sandra auxiliares del laboratorio por su apoyo brindado y palabras de aliento que me han motivado a seguir adelante ...las quiero mucho.

A la Q.F.B Cyndia Azucena González Arias por su grandiosa amistad y apoyo en la realización de este trabajo, gracias por los buenos momentos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio Susy, Alma, Paco, Lizdy quienes me han hecho pasar tardes amenas, por su apoyo brindado durante los momentos de trabajo en el laboratorio, pero mi más especial agradecimiento por su invaluable amistad.

A mi gran amiga Cyndia Azucena gracias por su gran amistad durante todo este tiempo, y que a pesar de la distancia, estas presente amiga, gracias por confiar en mí.

A Roxana y Cristy por haberlas conocido en este laboratorio y haber pasado muy buenos momentos y que a pesar que ya no nos une el laboratorio nos une la amistad que generamos aquí.

A mis compañeras de Maestría Laura y Yael por compartir sus conocimientos, experiencias, momentos de estrés, risas y sobre todo por su gran amistad.

A Eliseo Fonseca Ramírez por ser un gran apoyo en estos momentos y sobre todo por tu paciencia amistad y gran comprensión.

A Alma, Yoli y Bryana quienes han sido buenas amigas, por su apoyo en todo momento y por compartir unos minutitos de charla conmigo.

A mis amigas incondicionales Bianca, Sarai, Dalia, Olivia y a mi prima Karla, por estar siempre conmigo en todo momento cuando las necesité, por tantos momentos compartidos amigas mil gracias.

A mis tíos Álvaro Reyes Peña y Rosalba Guzmán Bañuelos por su gran apoyo, y principalmente gracias tío por ser como un padre para mí, gracias por su gran cariño y amistad.

A Gilda Susana Reyes Peña por enseñarme a ser noble, y a ver la vida con alegría, y estar conmigo en todo momento mil gracias.

A mis primos Christian y Álvaro por confiar en mí como amiga, por mostrar interés en este estudio.

A CONACYT, por el apoyo económico proporcionado a través de la beca que me fue otorgada.

A los fumigadores urbanos y controles gracias por haber participado y haber hecho posible el presente trabajo.

DEDICATORIA

A ti Soledad Reyes Peña por todo lo que soy hasta el día de hoy, por ser un ejemplo a seguir, por ser padre y madre a la vez para mí, por ser mi gran amiga en todo momento, por cuidar de mí en todo momento, por sentirte orgullosa de mí, por fomentar en mí el salir adelante como tú lo has hecho hasta el día de hoy conmigo y con mi hermana, por enseñarme a luchar por una vida mejor, a ti que te debo la vida, la verdad es que no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí te quiero mucho madre.

A mi hermana Dayan por su apoyo y paciencia durante todo este tiempo y sobre todo por su gran cariño.

A mi abuela María Soledad Peña Sánchez, aunque ya no estés presente, te recuerdo a cada momento y te agradezco tu gran cariño que aún sigo sintiendo y por ser quien me motiva a seguir día día.

RESUMEN

Los plaguicidas son compuestos que han sido ampliamente utilizados en todo el mundo. La exposición a estos contaminantes se ha asociado con efectos adversos a la salud. Algunos estudios refieren una asociación significativa entre la exposición ocupacional a plaguicidas y daño genético. En este trabajo se determinó: El patrón de uso de plaguicidas de los fumigadores a través de un cuestionario estructurado; La actividad acetilcolinesterasa (AChE) por espectrofotometría; biomarcadores de daño genético, mediante el ensayo de micronúcleos (MN) por bloqueo de citocinesis; Identificación del genotipo de PON1 192 por PCR en tiempo real y la expresión génica mediante el análisis de microarreglos. De acuerdo a los resultados obtenidos, los plaguicidas más utilizados para la fumigación de ambientes urbanos tuvieron el siguiente orden: piretroides, cumarinas y organofosforados. La mayor frecuencia de servicios de fumigación fue para verano seguido de primavera. No se encontraron diferencias en la actividad acetilcolinesterasa de acuerdo a los grupos de estudio. Si hubo diferencias en la frecuencia de micronúcleos (MN), puentes nucleoplásmicos (NPB), gemaciones y apoptosis. Por otra parte en cuanto a las células en estado de necrosis de e índice nuclear no se encontraron diferencias. De acuerdo a los resultados de regresión lineal, los individuos que portan el genotipo PON1 192 QQ tuvieron un mayor número de apoptosis, puentes, necrosis y donas con respecto a los PON1 192 RR, con ajuste del modelo por el tiempo de exposición. El índice de fumar mostró una asociación significativa con la presencia de micronúcleos en los fumigadores con respecto al grupo control, el consumo de alcohol mostró una asociación con la frecuencia de puentes nucleoplásmicos. En cuanto a los resultados de expresión génica, se encontró alteración en la expresión de 1, 856 genes. Entre los genes con mayor diferencia en su expresión, se encuentran algunos involucrados en ciclo celular, así como en diferentes tipos de cáncer. En conclusión, los fumigadores que participaron en este estudio tuvieron un mayor daño genético, con respecto al grupo control, así como también mostraron diferencias en la expresión de genes relacionados con ciclo celular y algunos tipos de cáncer. Por lo anterior, se sugiere el uso de baterías de biomarcadores que puedan detectar daños en

diferentes niveles de organización, con la finalidad de evaluar de manera integral los efectos de la exposición a plaguicidas en este tipo de poblaciones.

ABSTRACT

Pesticides are used worldwide and exposure to these compounds has been associated with several adverse effects. The aims of this study was to examine the pattern of pesticide use, biomarkers genotoxicity, citotoxicity, citostaticity, acetylcholinesterase (AChE) activity, and gene expression in urban pesticide sprayers and a control group from Nayarit State, Mexico. A cross-sectional study was carried out 20 male urban sprayers and 20 controls (aged 18-55 years). A structured questionnaire was used to obtain information about the subjects' patterns of pesticide use, anthropometrical characteristics, lifestyle and medical history. Frequencies MN, buds and NB were determined by counting 1000 binucleated cells with preserved cytoplasm; apoptotic and necrotic cells were determined in 500 cells according to Fenech 2003. AChE activity was determined spectrophotometrically adjusted by hemoglobin according to Worek 1999 with some modifications. Results indicate that pesticides used to fumigate the urban environments (houses, hospitals, schools and others) are pyrethroids (40.6%), followed by coumarins (15.7%) and organophosphates (15.6%). The geometric mean of AChE activity was 32.3 U/g Hb (range 24.4 -38.9 U/g Hb) in urban sprayers and 33.9 U/g Hb (range 24.5-45.3 U/g Hb) in the control group ($p=0.22$). The mean of MN was (12.1) in urban sprayers when compared to the control group (5.9). The frequency of apoptotic cells, buds and nucleoplasmic bridges (NBP) showed significant differences. There was not significant differences in the frequency of buds, NBP, necrotic cells and nuclear index, while the urban sprayers showed more number of apoptotic cells, these difference was significantly marginally. Some genes involved in the regulation of cellular processes including cell division, differentiation, motility, adhesion and death, compared to the control group.

In conclusion, these results suggest that pesticide exposure in urban sprayers may modulate gene expression in some types of cancer in this study population and the biomarkers of genotoxicity evaluated in the participants showed more genetic damage in the urban sprayers compared with the control group .

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Presencia de un micronúcleo en una célula binucleada	5
Figura 2	Célula mononucleada (a), binucleada (b) y polinucleada (c)	17
Figura 3	Frecuencia de fumigaciones por época de año	23
Figura 4	Lugares en donde son más requeridos los servicios de fumigación urbana	24
Figura 5	Patrón de uso de plaguicidas en las fumigaciones de ambientes urbanos	25
Figura 6	Piretroides utilizados en fumigaciones de ambientes urbanos	25
Figura 7	Plaguicidas cumarínicos más utilizados	26
Figura 8	Plaguicidas organofosforados más utilizados	26
Figura 9	Actividad acetilcolinesterasa de acuerdo al grupo de estudio	32
Figura 10	Índice nuclear de acuerdo al grupo de estudio	34
Figura 11	Frecuencia de MN/1000 células binucleadas de acuerdo a los grupos de estudio	35
Figura 12	Apoptosis/500 células de acuerdo al grupo de estudio	38
Figura 13	Número de gemaciones de acuerdo al grupo de estudio	39
Figura 14	Puentes nucleoplásmicos de acuerdo al grupo de estudio	40
Figura 15	Necrosis/500 células de acuerdo al grupo de estudio	41
Figura 16	Donas/500 células de acuerdo al grupo de estudio	42
Figura 17	Frecuencias genotípicas de PON1 192	42
Figura 18	Esquema que muestra el resultado del análisis de microarreglos (a) junto con el experimento control (b)	47

Figura 19	Mapa general de la expresión génica de los fumigadores urbanos con relación al grupo control	48
Figura 20	Genes que mostraron una mayor diferencia en su expresión en los fumigadores con respecto al grupo control	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Antecedentes de daño genético en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas	6
Tabla 2	Procedimiento estándar para la determinación de la actividad de AChE	14
Tabla 3	Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el polimorfismo PON1 192	18
Tabla 4	Secuencia de sondas Taqman para la determinación del polimorfismo PON1 192	18
Tabla 5	Condiciones de trabajo para PCR en Tiempo-Real	19
Tabla 6	Características antropométricas, laborales y de educación de la población de estudio	27
Tabla 7	Principales signos y síntomas referidos por fumigadores urbanos	29
Tabla 8	Frecuencia de uso de equipo de protección en fumigadores urbanos (n /%)	30
Tabla 9	Medias geométricas de AChE (U/mL), Hb y AChE (U/g de Hb) de acuerdo al grupo de estudio	31
Tabla 10	Principales síntomas con respecto a la actividad acetilcolinesterasa	33
Tabla 11	Tiempo de exposición y hábitos nocivos	33
Tabla 12	Comparación de los promedios de biomarcadores de daño genético con respecto al de la actividad AChE	37
Tabla 13	Biomarcadores de daño genético de acuerdo al genotipo de PON1 192	43
Tabla 14	Regresión lineal entre parámetros de genotoxicidad y algunas variables	46
Tabla 15	Genes reprimidos en linfocitos de fumigadores	49
Tabla 16	Genes sobreexpresados en linfocitos de fumigadores	50

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AC	Aberraciones cromosómicas
AChE	Actividad acetilcolinesterasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	ADN complementario
RNA	Ácido ribonucleico
ATSDR	Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades
BN	Células binucleadas
CBM	Carbamatos
CBMN	Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis
CG	Citosina-Guanina
Cyt B	Citocalacina B
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético
EPA	Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos
Hb	Hemoglobina
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
IN	índice de división nuclear

M	Molar
MN	Micronúcleos
NaOH	Hidróxido de sodio
NCBI	Centro Nacional de Información y Biotecnología
NPB	Puentes nucleoplásmicos
OC	Organoclorados
OF	Organofosforados
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Piretroides
PON1	Paraoxonasa 1

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	i
Lista de tablas	ii
Lista de figuras	iii
Resumen	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Plaguicidas	1
1.2 Plaguicidas en México	2
1.3 Exposición a plaguicidas	3
1.4 Toxicidad por plaguicidas	3
1.5 Efectos genotóxicos	4
1.6 Ensayo de micronúcleos como biomarcador de daño genético	4
1.7 Enzima Paraoxonasa humana (PON1)	5
1.8 Expresión génica	7
1.9 Evaluación de la expresión génica	8
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. HIPÓTESIS	10
4. OBJETIVOS	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.1 Diseño del estudio	12
5.2 Evaluación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)	13
5.3 Evaluación del daño genotóxico	15
5.4 Determinación del Polimorfismo PON1 192	17
5.5 Determinación de la expresión génica	19

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

mediante el análisis de microarreglos

5.6. Análisis estadístico	22
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
8. CONCLUSIONES	53
9. BIBLIOGRAFÍA	54



1. INTRODUCCIÓN

1.1 Plaguicidas

Los plaguicidas son compuestos ampliamente utilizados en todo el mundo. La exposición a estos contaminantes se ha asociado con efectos adversos a la salud. Dentro de los plaguicidas se incluyen una gran variedad de sustancias con diferentes propiedades y composición, que tienen como objetivo común eliminar plagas que dañan los cultivos, la salud de los humanos o animales (EPA, 2008).

Los plaguicidas pueden ser clasificados de acuerdo a los criterios siguientes: i) uso, ii) composición química, iii) naturaleza química, iv) acción específica, v) concentración, vi) formulación, vii) modo de acción, viii) grado de toxicidad y ix) persistencia en el ambiente. Dentro de la clasificación, con base a su naturaleza química, se encuentran los organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides, entre otros (COFEPRIS, 2004).

Plaguicidas organoclorados (OC)

Los OC, son hidrocarburos aromáticos clorados y algunos contienen elementos como oxígeno y azufre, dentro de los más conocidos se encuentran el DDT, metoxicloro, hexaclorociclohexano, aldrín, endosulfán, entre otros (Ramírez y Lacasaña, 2001). Estos compuestos son solubles en disolventes orgánicos e insolubles en agua, tienen la capacidad de bioacumularse en la cadena trófica (ATSDR, 2002), son escasamente biotransformados en el organismo y debido a sus propiedades lipofílicas se depositan principalmente en tejido adiposo y leche (Moreno-Grau, 2003).

Plaguicidas organofosforados (OF)

Los OF son utilizados como insecticidas y en menor proporción como herbicidas. Son ésteres del ácido fosfórico o tiosfosfórico y se caracterizan por la presencia de un átomo de fósforo unido por un doble enlace a un sulfuro o a un átomo de oxígeno

(Maroni et al., 2000). Los OF se encuentran relacionados con la inhibición de la AChE de manera irreversible (Maroni, 1996).

Plaguicidas carbamatos (CBM)

Los CBM son ésteres del ácido carbámico, poco solubles en agua y se descomponen por hidrólisis en condiciones alcalinas. Se usan principalmente como insecticidas, nematocidas, fungicidas y herbicidas (González-Arias et al., 2010). Los CBM también inhiben a la enzima AChE por un mecanismo de toxicidad similar a los OF pero la unión formada es reversible (Maroni, 1996).

Plaguicidas Piretroides (PI)

Los PI son la forma más estable de piretrinas (insecticida natural derivado de la flor de crisantemo). Los PI son sustancias químicas manufacturadas de estructura muy parecida a las piretrinas. Es común su uso en el hogar para el control de insectos en animales domésticos, entre otros usos (ATSDR, 2003). Este tipo de compuestos a diferencia de los OC tienen poca capacidad de acumularse en los tejidos y son rápidamente degradados del ambiente (Ramírez y Lacasaña, 2001).

1.2 Plaguicidas en México

México es uno de los países con mayor uso de plaguicidas (COFEPRIS, 2004), originado por el tipo de prácticas agrícolas de los países en desarrollo, que prevalece de manera particular, en los países latinoamericanos; esta situación está basada principalmente en la escasa o casi nula rotación de cultivos, producción intensiva y mecanización, lo que conduce a una alta demanda de agroquímicos. De las 40,000 toneladas de plaguicidas que se usan en el país, aproximadamente dos terceras partes se fabrican en el ámbito nacional, mientras que una tercera se adquiere en otros países (Rivero y González 2001).

1.3 Exposición a plaguicidas

Los trabajadores expuestos a plaguicidas son aquellos relacionados a la producción, formulación, transporte, almacenamiento, uso y, desecho de estos productos. Entre ellos, el riesgo es mayor para trabajadores en países en desarrollo ya que, están expuestos a los plaguicidas generalmente sin protección, supervisión ni adiestramiento adecuado. Un sector conocido como vulnerable son los trabajadores agrícolas, especialmente los jornaleros expuestos con frecuencia a diversos plaguicidas. Así mismo, los plaguicidas forman parte de la vida cotidiana ya que no sólo son usados en trabajos agrícolas, son también empleados en la industria, hogares y muchos otros usos que representan una fuente de exposición para la población general, pero que no se conocen o no se tiene una conciencia clara de ellos. La inhibición de enzimas cruciales para la vida es sólo una de sus formas de acción. Muchos otros de sus mecanismos son aún desconocidos.

Así mismo, alrededor del 65% del consumo nacional de plaguicidas se aplica en la agricultura y el restante se emplea en el combate de los vectores transmisores de enfermedades, control de plagas en el hogar, la industria y otras áreas (CESAVEJAL, 2003). La exposición a plaguicidas se ha asociado con un incremento de daño genético. Un sector de trabajadores ocupacionalmente expuestos, es el de fumigadores urbanos. Actualmente la Secretaría de Salud cuenta con registros sanitarios de las empresas dedicadas a la fumigación urbana, no obstante, son escasas las referencias en la literatura en donde se ha evaluado la exposición a plaguicidas en esta población.

1.4 Toxicidad por plaguicidas

Toxicidad aguda

Uno de los principales problemas con los plaguicidas es la toxicidad aguda. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2004 estima alrededor de tres millones de ingresos hospitalarios por intoxicación con plaguicidas cada año y alrededor de 220,000 muertes (OMS, 2004).

En exposiciones agudas los OF se caracterizan por inhibir la enzima AChE (Padilla et al., 2000; Maroni et al., 2000), lo que causa neurotoxicidad, la cual puede ser descrita como una crisis colinérgica debido a una sobre-estimulación del sistema nervioso. Los principales signos y síntomas de toxicidad colinérgica por OF son: miosis, broncoconstricción, diarrea, hipersalivación, debilidad muscular, confusión, cambios en el ritmo cardíaco, náuseas, vómitos, sudoración, dolor de cabeza y dificultad para caminar. Una intoxicación severa puede provocar la pérdida del conocimiento, edema pulmonar, paro respiratorio y muerte (Costa et al., 2002).

Toxicidad crónica

La exposición crónica a estos contaminantes se ha asociado con efectos inmunológicos (Lima y Vega, 2005), a nivel del sistema nervioso (Keifer y Firestone, 2007), endocrinos (Keice et al., 1998; Carreno et al., 2007) y reproductivos (Wigle et al., 2008). La capacidad mutagénica de estos compuestos, así como su probable asociación con el desarrollo de cáncer de mama, próstata, linfomas, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin y leucemias (Alavanja et al., 2004).

1.5 Efectos genotóxicos

Los estudios para evaluar la genotoxicidad de plaguicidas en humanos, se han enfocado a valorar el potencial genotóxico de los mismos en poblaciones ocupacionalmente expuestas. Algunos trabajos refieren una asociación significativa entre la exposición ocupacional a mezclas complejas de plaguicidas y la presencia de aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y micronúcleos. La mayoría de estos estudios encuentran efectos dosis dependiente, así como una relación directa con el tiempo y la intensidad de exposición. El daño cromosómico provocado por plaguicidas parece ser transitorio en exposiciones agudas, pero acumulativo en exposiciones crónicas (Bolognesi, 2003 y 2011).

1.6 Ensayo de micronúcleos como biomarcador de daño genético

El ensayo de micronúcleos (MN) por bloqueo de citocinesis (CBMN) es un método citogenético validado para evaluar la frecuencia de MN (Fenech, 2000), que se

originan del rompimiento o de la pérdida de cromosomas completos en células nucleadas (Figura 1).

La importancia de este ensayo se debe a su gran versatilidad, ya que permite evaluar parámetros como MN, índice nuclear (IN), gemaciones, puentes nucleoplásmicos (NPB) y células apoptóticas, lo que permite una información más completa de los efectos citostáticos y genotóxicos de un compuesto en particular (Fenech, 2000).



Figura 1. Presencia de un micronúcleo en una célula binucleada

Numerosos estudios han utilizado esta herramienta como un biomarcador de daño genotóxico ante la exposición a plaguicidas y mezclas de los mismos (Tabla 1).

1.7 Enzima Paraoxonasa humana (PON1)

La PON1 es una A esterasa dependiente de Ca^{2+} capaz de hidrolizar metabolitos activos de insecticidas OF e hidrolizar ésteres aromáticos. Se sintetiza principalmente en hígado y una proporción es liberada al torrente sanguíneo, donde se encuentra asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL). La PON1 recibe su nombre por el paraoxón, metabolito tóxico del plaguicida paratión, el cual es uno de los sustratos más estudiados. La actividad de PON1 depende en parte, de la presencia de polimorfismos genéticos en el gen de PON1 (Costa et al., 2005).

Gen de PON1

El gen de PON1 forma parte de una familia de multigenes: PON1, PON2 y PON3, localizados en el cromosoma 7q21-22. Las proteínas codificadas por estos genes muestran una elevada similitud en sus características estructurales y tienen

alrededor del 65% de identidad a nivel de aminoácidos (Primo-Parmo et al., 1996). El gen de PON1 ha sido clasificado como polimórfico, es decir que presenta variaciones interindividuales con frecuencia del 1% o más dentro de una población (Nelson, 2002). Se han descrito polimorfismos en la región promotora del gen de PON1, de los cuales cinco son los más estudiados: -108 (C/T), -126 (G/C), -162 (A/G), -832 (G/A) y -909 (C/G) (Suehiro et al., 2000).

Tabla 1. Antecedentes de daño genético en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas

País	Población	Resultados	Referencia
Turkia	Agricultores	Mayor número de MN, NPB y gemaciones en expuestos	Coskun et al., 2011
Pakistan	Recolectoras de algodón	Incremento significativo de MN en población expuesta	Ali et al., 2008
Brasil	Agricultores	Frecuencia más alta de MN en expuestos	da Silva et al., 2008
Brasil	Fumigadores	Frecuencia mayor de MN y NPB en el grupo expuesto e IN menor	Kehdy et al., 2007
Portugal	Agricultores y trabajadores de invernaderos	Mayor frecuencia de MN	Costa et al., 2006
Croacia	Trabajadores en la producción de plaguicidas	Mayor frecuencia de MN en el grupo expuesto	Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2002
Italia	Floriculturistas	Incremento significativo de MN con respecto al grupo control	Bolognesi et al., 2001
Chile	Fumigadores	No hubo diferencia estadística entre grupos	Venegas et al., 1998
Yugoslavia	Agricultores	No hubo diferencia estadística entre grupos	Joksić et al., 1997
Australia	Fumigadores	No hubo diferencia estadística entre grupos	Barbosa et al., 1994

En la región reguladora se encuentra el polimorfismo PON1 192 (R/Q) y ha sido el más estudiado (Davies et al., 1996). Los primeros estudios indican que la isoforma PON1 R192 puede hidrolizar el paraoxón más fácilmente que la isoforma PON1 Q192 (Humbert et al., 1993). Otros estudios sugieren que este polimorfismo afecta significativamente la eficiencia catalítica de PON1 de manera sustrato-dependiente. El estudio *in vitro* de la isoforma PON1 Q192 hidroliza más rápidamente al diazoxón, sarín y somán más que la isoforma PON1 R192 (Davies et al., 1996).

PON1 y OF

Diversos estudios han sugerido que la variación interindividual en la actividad de PON1 puede tener implicaciones en la susceptibilidad a los efectos ocasionados por los OF. En el estudio realizado por Cherry et al. (2002), encontraron una asociación entre la presencia del alelo PON1 R192 con síntomas de intoxicación crónica en individuos expuestos a diazinón. Adicionalmente, estudios en veteranos de guerra del Golfo Pérsico encontraron asociación entre los síntomas neurológicos y el alelo PON1 Q192. Además, se ha reportado un incremento del 59% en la prevalencia de intoxicaciones crónicas en aplicadores de OF que portan el alelo PON1 Q192 (Lee et al., 2003).

1.8 Expresión génica

Un gen es el conjunto de secuencias de DNA, necesarias para codificar un producto génico. Éste consta de dos regiones: una estructural (intrones y exones) que determina la expresión del gen; la otra es la región reguladora, sin función codificante que contiene regiones promotoras, encargadas de interactuar con los factores de transcripción proteicos para regular positiva o negativamente el inicio de la transcripción (Luque y Herráez, 2001). Las características que definen a una célula están dadas por las proteínas que la constituyen, las cuales son el resultado de patrones específicos de la expresión de sus genes (Felsenfeld y Groudine, 2003).

Regulación génica

La expresión de algunos genes está sujeta a regulaciones complejas, que dependen de secuencias promotoras, de acuerdo a su función, elementos específicos de regulación, módulos de control o elementos de respuesta. Estas secuencias son muy variadas y específicas para cada gen. Otra particularidad es que actúan tanto en la activación como en la reducción de la transcripción. Se clasifican en: 1) potenciadores (enhancers) y 2) silenciadores o inhibidores (Recillas et al., 2004).

Regulación epigenética

Este tipo de regulación de la expresión génica contribuye a explicar la diversidad morfológica y funcional de células con un mismo genoma, depende del llamado componente epigenético de la estructura del DNA, es decir, no consistente en su secuencia. Esto se ejerce a través de la metilación específica de algunas bases en el DNA (Jones y Baylin, 2002). En el DNA de vertebrados, una parte de los residuos de citosina (en humanos, el 3%) se encuentran metilados principalmente en posición 5'. Esta metilación aparece casi exclusivamente sobre la secuencia dinucleótida CG, que además es especialmente abundante en las regiones promotoras de los genes, dando lugar a los islotes denominados islotes CpG. Los genes que se transcriben activamente en ciertos tejidos poseen islotes CpG sin metilar (islotes hipometilados) mientras que, en los tejidos donde el gen no se expresa están metilados. Por tanto la metilación de la citosina parece desempeñar un papel importante en la regulación de la expresión génica (Li, 2002).

1.9 Evaluación de la expresión génica

La evaluación de la expresión génica es una herramienta útil para identificar y clonar genes diferencialmente expresados entre dos o más poblaciones de RNAm, desde pequeñas cantidades. Está basada en el supuesto de que prácticamente todo el RNAm expresado puede ser transcrito reversamente en DNA complementario (DNAc) (Larkin et al., 2003). El desarrollo de técnicas en biología molecular ha permitido evaluar la expresión de cientos de genes simultáneamente (Buitelle et al., 2002). Dentro de estas técnicas se encuentran la técnica de PCR, RT-PCR, PCR en tiempo

real, Northern Blot y el análisis de microarreglos (Larkin et al., 2003, Gwinn y Weston, 2008).

Microarreglos de DNA

Los microarreglos de DNA son placas de vidrio, nylon o silicona, compuestas por pozos de 100-300 nm, en las cuales cientos o miles de secuencias de genes se inmovilizan (NCBI, 2007). El primer microarreglo de DNA complementario fue producido por hibridación sobre laminillas de vidrio por Schena et al. (1995). La tecnología de los microarreglos fue diseñada por Brown y Bostein en el año de 1999, en la que fue posible evaluar los niveles de expresión de miles de genes al mismo tiempo (Ramírez et al., 2003; Gwinn y Weston, 2008).

Los arreglos son una herramienta novedosa en la biología molecular y las ciencias genómicas, relacionada con biomarcadores de exposición a diversas sustancias tóxicas (Gwinn y Weston, 2008).

2. JUSTIFICACIÓN

El uso masivo de plaguicidas en actividades agrícolas, pecuarias, industriales y domésticas ha tenido repercusiones no siempre favorables para el ambiente y la salud humana. Diversos estudios mencionan los efectos adversos producidos por estos compuestos, sin embargo, son escasos los estudios en donde se refieren los daños ocasionados en empleados dedicados a la fumigación industrial, doméstica y de servicios turísticos. Estos trabajadores pueden ser especialmente vulnerables, si se considera que el personal que labora en este tipo de negocios está constantemente expuesto a plaguicidas, desde su formulación hasta su aplicación, lo que puede aumentar de manera importante la exposición a estos xenobióticos.

Por lo anterior, es relevante evaluar el daño genético que producen los plaguicidas, a través del ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis y la citostaticidad en linfocitos de trabajadores expuestos a plaguicidas. Además de evaluar la posible modulación de estos efectos por el polimorfismo genético PON1 192, así como también la existencia de alteraciones en la expresión de genes que pudieran ser importantes en diversos procesos celulares o en el desarrollo de enfermedades, mediante el análisis de microarreglos.

3. HIPÓTESIS

Los fumigadores urbanos tienen un mayor daño genético modulado por la presencia del polimorfismo genético PON1 192, además de una expresión génica diferente con respecto al grupo control.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar biomarcadores toxicológicos en fumigadores urbanos de la ciudad de Tepic, Nayarit.

Objetivos específicos

1. Obtener el patrón de uso de los plaguicidas, frecuencia de uso de equipo de protección y características antropométricas en la población de estudio.
2. Determinar la actividad acetilcolinesterasa como biomarcador de exposición y daño, ocasionado por la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en los participantes.
3. Determinar la citostaticidad en linfocitos de fumigadores urbanos expuestos a plaguicidas.
4. Obtener la frecuencia de micronúcleos, gemaciones, puentes nucleoplásmicos y células apoptóticas mediante el ensayo de micronúcleos por bloqueo de citocinesis en la población de estudio.
5. Obtener la frecuencia del polimorfismo PON1 192 y su relación con micronúcleos, puentes, gemaciones y apoptosis en la población de estudio.
6. Determinar la expresión de genes mediante el análisis de microarreglos en una submuestra de la población.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y analítico en la ciudad de Tepic, Nayarit, México, en el que se invitó a participar a personas dedicadas a la fumigación urbana. Los trabajadores fueron identificados a través de los registros actuales de las empresas que ofrecen el servicio de fumigación. Se les explicó los objetivos generales del estudio y se les invitó a participar en el mismo.

Los individuos que aceptaron participar firmaron una carta de consentimiento informado y se les aplicó un cuestionario estructurado con la finalidad de evaluar características socioeconómicas, antropométricas, edad, dieta, historia clínica, hábitos nocivos (consumo de drogas, tabaco y alcohol) y exposición a plaguicidas.

Criterio de inclusión

- Individuos del género masculino, mayores de 18 años
- Trabajadores dedicados a la fumigación urbana

Criterios de exclusión

- Individuos que presentarán alguna enfermedad degenerativa
- Con consumo crónico de medicamentos
- Que consumieran drogas
- Que hayan estado expuestos a agentes mutagénicos (e.g. rayos X) seis meses antes de la invitación

Como grupo control se consideró a individuos que no tuvieran contacto con plaguicidas de manera ocupacional o con cualquier agente genotóxico. Se tomó en cuenta que las condiciones socioeconómicas, de salud, género, hábitos nocivos y de

educación, entre otras, fueran similares a las condiciones de los trabajadores de estudio.

Patrón de uso de plaguicidas

A partir del cuestionario estructurado se obtuvo información referente a la frecuencia de fumigaciones realizadas durante el año, número de marcas comerciales que se manejan en los establecimientos, así como la época del año y lugares donde son requeridos, con mayor frecuencia, sus servicios de fumigación.

5.2 Evaluación de la actividad acetilcolinesterasa (AChE)

La actividad AChE se realizó por el método propuesto por Worek et al. (1999). Para la evaluación de la actividad de AChE, se tomaron muestras sanguíneas de los participantes y controles con previa asepsia, mediante punción venosa del antebrazo, en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. La actividad de la AChE se corrigió por el contenido de hemoglobina. Con la finalidad de realizar la determinación exacta de AChE, se diluyó la muestra, debido a que la absorción de la hemoglobina coincide con la máxima absorción del indicador de color. La medición a 436 nm reduce la absorción de la hemoglobina en una cuarta parte con respecto a la lectura a 412 nm, mientras que la del indicador es del 80%; motivo por lo cual la medición se realiza a 436 nm; como inhibidor selectivo de butirilcolinesterasa plasmática (BChE) se utilizó etopropazina. En la **Tabla 2**, se presenta el procedimiento estándar para las determinaciones.

Determinación de hemoglobina (Hb)

Para la determinación de Hb se tomaron 10 µL de muestra y se diluyeron en 2.5 mL del reactivo de Drabkin. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se determinó su absorbancia a 540 nm frente a un blanco de reactivo.

$$\text{Hb en g/dL} = (\text{Abs}) (\text{patrón})$$

Tabla 2. Procedimiento estándar para la determinación de la actividad de AChE

Reactivos	Blanco (mL)	Muestra (mL)
Buffer de fosfatos 0.1 mol/L	1.0	1.0
pH 7.4		
DTNB 10 mM	0.05	0.05
Etopropazina 6 mM	0.005	0.005
Muestra 1:100	-----	0.5
Incubar a 37 °C por 10 min, luego añadir		
Sustrato (ATCh) 28.3 mM	0.025	0.025
Leer a 436 nm por 3 minutos		

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Para calcular la actividad AChE se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\Delta\text{Abs} = \frac{(\text{Abs1}-\text{Abs0})+(\text{Abs2}-\text{Abs1})+(\text{Abs3}-\text{Abs2})}{3}$$

$$\text{AChE en U/mL} = \left[\frac{\text{Vol. Total}}{(\text{E}) (\text{cm}) (\text{Vol. Muestra})} \right] \left[\frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1 \text{ mol}} \right] \left[\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} \right] \left[\frac{\Delta\text{Abs}_1}{\text{min}} \right]$$

Donde:

ΔAbs = promedio de los cambios de absorbancia de la muestra y del blanco

Abs 0= absorbancia de la muestra en el minuto cero

Abs 1= absorbancia de la muestra en el minuto 1

Abs 2= absorbancia de la muestra en el minuto 2

Abs 3= absorbancia de la muestra en el minuto 3

Vol. Total = volumen final de la reacción = 1.58 mL

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

1 cm = ancho de celda

0.005 mL = Vol. de la muestra (cantidad de sangre total contenida en la dilución)

$\Delta\text{Abs}_1 = \Delta\text{Abs}$ de muestra menos ΔAbs blanco

La corrección de la actividad de AChE por Hb se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{AChE en U/g de Hb} = \frac{\text{AChE en U/mL}}{\left[\frac{\text{Hb en g}}{100 \text{ mL}} \right]}$$

5.3 Evaluación del daño genotóxico

Para determinar la citostaticidad y genotoxicidad cada participante proporcionó una muestra de sangre venosa, extraída por venopunción en tubos de prolipropileno con heparina (vacutainer®). Para la toma de sangre se consideró que los donadores no consumieran ningún tipo de medicamento al menos 15 días previos a la toma de la muestra y que no se hubieran enfermado durante la semana anterior al muestreo.

Cultivo y cosecha celular

Para la siembra de los cultivos celulares se colocaron 6.3 mL de medio de cultivo RPMI 1640 (sigma®) previamente suplementado con aminoácidos no esenciales (sigma®) y L-glutamina al 1% (sigma®), y se les añadió 200 µL de fitohemaglutinina (sigma®) y 0.5 mL de sangre completa en tubos falcon de 15 mL. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 44 h, al término de las cuales se les adicionó 21 µL Cyt-B (sigma®) para inhibir la citocinesis y se incubaron durante 24 h más. Transcurridas

las 72 h, los cultivos se transfirieron a tubos redondos de centrifuga donde se prefijaron con 1 mL de solución fijadora Carnoy's (metanol (baker®)-ácido acético 3:1(sigma®)). Se centrifugó a 1200 rpm/10 min en una centrifuga (ependorf- 5804®) y se separó el sobrenadante, los paquetes celulares se resuspendieron y fijaron con 7 mL de la misma solución. Se realizaron lavados con la solución fijadora hasta la obtención de un botón celular limpio, enseguida se le añadió 1 mL de tripsina (sigma®) al 0.0025% y 5 mL de solución Carnoy's. Se centrifugó a 1200 rpm/10 min, se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con solución Carnoy's. Como control positivo de genotoxicidad se sembraron dos cultivos celulares, los cuales se trataron con mitomicina C (1 µg/mL) (sigma®) a las 24 h de incubación.

Preparación de laminillas

El botón celular se resuspendió con una micropipeta, se colocaron gotas del botón celular en portaobjetos esmerilados, se dejaron secar a temperatura ambiente y una vez secos se tiñeron 15 segundos en solución eosina y posteriormente 15 segundos en solución azul de metileno (hemacolor®). Por último, se enjuagaron con agua de grifo y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Evaluación de micronúcleos (MN), gemaciones y puentes nucleoplásmicos

La evaluación de MN, gemaciones y puentes nucleoplásmicos se realizó mediante la técnica de MN por bloqueo de la citocinesis, de acuerdo a la metodología propuesta por Fenech et al. (2003). La identidad de los participantes se ocultó al cubrir las laminillas, mismas que fueron codificadas para realizar la lecturas correspondientes; se observaron y contabilizaron 1000 células binucleadas usando un microscopio fotónico (Motic®) con el objetivo de inmersión (100X).

Evaluación de la citostaticidad celular

El índice nuclear (IN) se evaluó de acuerdo al método propuesto por Eastmond y Tucker (1998). El IN es un parámetro utilizado para conocer la respuesta mitogénica de los linfocitos. Este índice se calculó a partir de observar y contar 200 células y

determinar la frecuencia de células con 1, 2, 4 o más núcleos (Figura 2). Los cálculos se hicieron con la siguiente fórmula:

$$IDN = [M1 + 2(M2) + 3(M3)] / N$$

En donde M1-M3 representa el número de células con 1 a 4 o más núcleos y N representan el número total de células contadas.

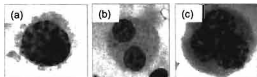


Figura 2. Célula mononucleada (a), binucleada (b) y polinucleada (c).

Evaluación de apoptosis y necrosis

Para evaluar la frecuencia de células en estado de apoptosis y necrosis se contabilizaron 500 células. Las células en apoptosis se caracterizan por condensación de la cromatina, fragmentación de la membrana nuclear y por la presencia de cuerpos apoptóticos dentro de la membrana citoplásmica intacta. Las células en necrosis se caracterizan por la presencia de vacuolas en el citoplasma o el núcleo y desintegración de la membrana citoplásmica (Fenech et al., 2003).

5.4 Determinación del Polimorfismo PON1 192

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se usó el Kit "High Pure PCR Template Preparation Roche, se preparó una mezcla de 200 μ L de sangre, 200 μ L de solución amortiguadora de unión (guanidina-HCl 6 M, urea 10 mM, Tris-HCl 10 mM, Triton X-100 v/v 20%, pH 4.4) y 40 μ L de proteinasa K (20 mg/mL). Se incubó a 72 °C por 10 minutos, posteriormente, se le adicionó 100 μ L de isopropanol, se mezcló y transfirió a una minicolumna pre-empacada con fibra de vidrio; se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm. El sobrenadante se eliminó y se agregaron a la columna 500 μ L de

solución de inhibición (etanol, guanidina- HCl 5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 6.6) se centrifugó por 1 minuto a 8,000 rpm (este procedimiento se realizó dos veces). El DNA se eluyó de la columna mediante la adición de una solución baja en sales (10 mM Tris, pH 8.5) previamente calentada a 70 °C y centrifugada a 8,000 rpm durante 1 minuto. La pureza y concentración de DNA se analizó mediante la relación de la absorbancias a 260 y 280 nm mediante el uso de un espectrofotómetro de luz UV-Visible (Thermo®). La integridad del DNA se analizó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador de luz UV.

PCR en tiempo real

La determinación del polimorfismo PON1 192 se realizó por PCR en Tiempo Real a través del sistema Taqman® Universal Master Mix. Las mezclas de reacción para PCR se llevaron a cabo con 7.5 µL de Taqman® Master Mix (Applied Biosystem incluye enzima Amplitaq DNA polimerasa, AmpErase® UNG, dNTPs y dUTP, una molécula fluorescente pasiva), 0.375 µL de la mezcla de oligonucleótidos (36 µM) (Tabla 3) y sondas Taqman® (8 µM) (Tabla 4). Por último se agregaron 20 ng de DNA y se completó a un volumen final de 15 µL con agua inyectable.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para el polimorfismo PON1 192

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos
PON1 192 F	CTGAGCACTTTTATGGCACAAATGA
PON1 192 R	ACCACGCTAAACCCAAATACATCTC

Tabla 4. Secuencia de sondas Taqman para la determinación del polimorfismo PON1 192

Fluorocromo	Secuencia de Sondas Taqman
VIC	CCTACTTACAATCCTG
FAM	CCCTACTTACGATCCTG

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo ABI PRISM 7000[®] Sequence Detection System con las condiciones de amplificación que se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Condiciones de trabajo para PCR en Tiempo-Real

Pasos Iniciales	Tiempo y Temperaturas	
	40 Ciclos	
	Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
50 °C (2 minutos)	95 °C (15 segundos)	60 °C (60 segundos)
95 °C (10 minutos)		

Una vez concluida la reacción, se analizaron las curvas de amplificación para llevar a cabo la discriminación alélica. La interpretación de las fluorescencias obtenidas, se correlacionó con el fluorocromo del genotipo correspondiente.

5.5 Determinación de la expresión génica mediante el análisis de microarreglos

Para cumplir con este objetivo se realizó un segundo muestreo en el que se invitó a participar a cinco fumigadores y cinco individuos control, quienes habían participado en la etapa anterior del estudio. A los participantes se les tomó una muestra de sangre para realizar la extracción de linfocitos por el método propuesto por Boyum (1968). En un tubo (falcon®) de 15 mL se colocaron 4 mL de Ficoll (sigma®) a temperatura ambiente y 4 mL de sangre con cuidado de que no se mezclaran, se centrifugó a 1,600 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez centrifugada la muestra, se retiró el plasma con una pipeta pasteur y el anillo de linfocitos se transfirió a un tubo eppendorf y se lavó con solución salina (1:1), se centrifugó a 1,500 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos y se decantó el sobrenadante. El lavado se repitió dos veces más para obtener una pastilla limpia que se empleó para la extracción del RNA.

Extracción de RNA total por el método del Trizol

A la pastilla de linfocitos se le añadió 1 mL de trizol y se homogenizó mediante resuspensión con una micropipeta. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos, seguido de una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó a 13,200 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se le añadieron 500 μ L de isopropanol, se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó durante 10 minutos a 13,200 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue removido y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 70% en agua DEPC (0.1%) y se centrifugó a 7,500 rpm a 4 °C. La pastilla se disolvió en 40 μ L de agua DEPC (0.1%) y se almacenó a -70 °C.

Integridad de RNA

Se verificó la integridad del RNA en un el gel de agarosa al 1%, se colocó 1 μ L de muestra y 1 μ L buffer de carga, el corrimiento electroforético se realizó a 100 volts durante 30 minutos, se tiñó el gel de agarosa durante 15 minutos en bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador UV.

Tratamiento del RNA total

Las muestras se ajustaron a un volumen de 100 μ L con agua DEPC, posteriormente se agregaron 10 μ L de acetato de sodio pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Se mezclaron por inversión y se incubaron durante 30 minutos a -70 °C. Se centrifugaron durante 15 minutos a 14,000 rpm, el sobrenadante se decantó, la pastilla se lavó dos veces con 500 μ L de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar nuevamente durante 15 minutos a 1,400 rpm y se decantó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente, se resuspendió en 10 μ L de agua DEPC.

Síntesis de DNAc / Marcaje de RNA total

Para la síntesis de DNAc se prepararon dos mezclas (A y B). A la mezcla **A** se le añadieron 6 μ L de RNA (controles o fumigadores), 1 μ L de oligo (dt) (0.5 μ g/ μ L), 1 μ L

de primers (3 µg/µL) y posteriormente se ajustó el volumen a 19 µL con agua inyectable. Las mezclas se agitaron varias veces y se incubaron a -70 °C por 10 minutos. A la mezcla **B** se le agregó 8.0 µL de buffer de reacción 5X, 2.0 µL de MgCl₂ (25mM), 4.0 µL de aminoallyl-dNTP, 4 µL de DTT (0.1 M) y 3.0 µL de transcriptasa reversa (200 U/µL). Las mezclas se agitaron y se centrifugaron, seguido de dos incubaciones, la primera de 10 minutos a 25 °C y la segunda de 2 horas a 42 °C.

Hidrólisis de RNA

Se añadieron 5 µL de NaOH (1N) y 1 µL de EDTA (0.5 M) y se incubó durante 10 minutos a 65 °C, y se añadieron 25 µL de HEPES (1 M) pH 7.5. Posteriormente se realizó la purificación del aminoalil DNAc (aaaDNAc) con el kit QIAGEN®.

Reacción de conjugación

Se disolvió el colorante (Alexa 555 y Alexa 647) con 4.5 µL de DMSO, se mezcló y se agregaron 4.5 µL del aacDNA purificado, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 60 minutos.

Pretratamiento del microarreglo

Se prehidrató la laminilla mediante la exposición del lado impreso al vapor de agua a 60 °C durante 10 segundos, la laminilla se secó por centrifugación al vacío, (este paso se repitió tres veces), se fijó la laminilla con dos ciclos de luz UV 0.12 j x cm², se colocó en agua hirviendo durante 2 minutos y se incubó en solución de prehibridación (SSC-5X, SDS 0.1 %, BSA 1%) por una hora a 42 °C. Se lavó cinco veces con agua destilada, desionizada estéril (dde) a temperatura ambiente y se secó por centrifugación a 1,500 rpm durante 5 minutos.

Hibridización

Las muestras se concentraron por centrifugación al vacío, después el cDNA de los controles fue marcado con las moléculas Alexa 555 y Alexa 647, cada grupo de DNAc se ajustó a 70 µL con solución de hibridación. Enseguida se realizó la

desnaturalización por 5 minutos a 94 °C y 30 segundos a 65 °C, la mezcla se aplicó al arreglo, se le colocó un cubreobjetos y se dejó incubar durante 18 h a 42 °C.

Lectura de microarreglos

El análisis de expresión génica, mediante la técnica de microarreglos, fue realizada en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La lectura de los arreglos se realizó mediante el sistema de microarreglos ScanArray 4000 Bio-Packard.

5.6 Análisis estadístico

Una vez realizada la captura y análisis de los datos registrados en los cuestionarios, así como los resultados obtenidos en la lectura de las laminillas y en los diferentes biomarcadores, se realizó el análisis estadístico descriptivo, para obtener medias y desviaciones estándar para las variables continuas y frecuencias, además de las proporciones para variables categóricas. Para el análisis comparativo entre grupos se utilizó la prueba t de student para variables continuas con distribución normal, o en su defecto la prueba de Mann-Whitney.

Para datos categóricos se utilizó la prueba de χ^2 . Se construyeron modelos de regresión para determinar la asociación entre las variables dependientes e independientes y se ajustó por las posibles variables confusoras. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los análisis estadísticos se hicieron con el programa estadístico Stata 8.0 (stata statistical software, stata corporation, college station, Texas).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las empresas que ofrecen el servicio de fumigación se identificaron a través de los registros proporcionados por la Secretaría de Salud. En este estudio participaron trabajadores de ocho empresas, así como del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Nayarit.

Con la finalidad de conocer en qué periodo del año se solicitan más servicios de fumigación y en consecuencia cuáles son los plaguicidas más usados, se encuestaron a los responsables de cada empresa y, de acuerdo con la información proporcionada, en verano es el periodo del año que presta más servicios de fumigación, seguido de primavera y otoño; en invierno se solicitan menos servicios de este tipo (Figura 3). Los sitios para los que se solicitan frecuentemente los servicios de fumigación son hogares, hospitales, industrias y escuelas (Figura 4).

Respecto al uso de plaguicidas, la información obtenida muestra que los insecticidas son los compuestos más utilizados, seguidos de los rodenticidas. Aunque en menor proporción, también se usan los fungicidas, herbicidas y larvicidas.

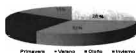


Figura 3. Frecuencia de fumigaciones por época de año

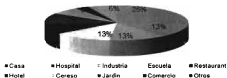


Figura 4. Lugares en donde son más requeridos los servicios de fumigación urbana

Los piretroides como la cipermetrina y deltametrina son los plaguicidas más frecuentemente utilizados en las fumigaciones urbanas, seguidos de las cumarinas y de los organofosforados (**Figura 5 y 6**). Es importante mencionar que existe escasa información sobre los efectos crónicos de los piretroides en humanos; no se han reportado efectos mutagénicos, teratógenos y carcinogénicos. Sin embargo en algunos estudios en animales han demostrado una reducción de la fertilidad en machos y hembras (ATSDR, 2003; Hayes, 2005; Brown, 2006).

Dentro de los plaguicidas cumarínicos, sólo se usan tres compuestos: brodifacoum, bromadiolona y warfarina (**Figura 7**). En cuanto a los organofosforados se utilizan también tres compuestos, clorpirifos, malatión y tefefos (**Figura 8**).

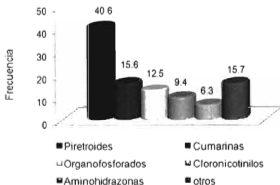


Figura 5. Patrón de uso de plaguicidas en las fumigaciones de ambientes urbanos.

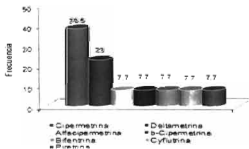


Figura 6. Piretroides utilizados en fumigaciones de ambientes urbanos

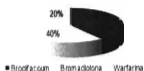


Figura 7. Plaguicidas cumarínicos más utilizados

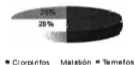


Figura 8. Plaguicidas organofosforados más utilizados

Características antropométricas y medidas de protección

En total participaron 20 personas dedicadas a la fumigación de ambientes urbanos y 20 individuos sin antecedentes de exposición ocupacional a plaguicidas (controles). La **Tabla 6** muestra los resultados obtenidos de las características antropométricas y laborales de la población de estudio.

Características antropométricas y medidas de protección

En total participaron 20 personas dedicadas a la fumigación de ambientes urbanos y 20 individuos sin antecedentes de exposición ocupacional a plaguicidas (controles). La **Tabla 6** muestra los resultados obtenidos de las características antropométricas y laborales de la población de estudio.

Tabla 6. Características antropométricas, laborales y de educación de la población de estudio

Parámetros	Fumigadores		Controles		valor de <i>p</i>
	GM*	IC (95%)**	GM*	IC (95%)**	
Edad (en años)	32.5	27.9-37.9	32.1	27.7-37.3	0.82
Peso (Kg)	76.3	70.5-82.7	78.8	73.7- 84.2	0.61
Estatura (cm ²)	173.8	170.4-177.3	173.4	170.1-176.7	0.75
Índice de Quetelet	25.3	23.9-26.9	25.9	23.8-28.3	0.95
Sobrepeso (n)	3	-	4	-	0.68
Obesidad (n)	4	-	5	-	0.70
Tiempo de trabajar como fumigador (n/%)					
<1 años			9/45		
1-5 años			5/25		
6-10 años			4/20		
11-15 años			2/10		
Nivel de educación (n/%)					
Educación primaria			1/5.5		
Educación secundaria			4/21		
Educación media superior			4/21		
Educación superior			10/52.5		

GM: media geométrica, **IC: intervalo de confianza

De acuerdo a los resultados, la media geométrica de edad de los fumigadores y de los controles no fue estadísticamente diferente (32.5 años *versus* 32.1), tampoco se observaron diferencias en los valores del índice de masa corporal (25.31 *versus* 25.92). Dentro del grupo de fumigadores tres personas tuvieron sobrepeso y cuatro obesidad, mientras que en el grupo de los controles cuatro tuvieron sobrepeso y cinco obesidad. En lo referente a la antigüedad en el trabajo, el 45% de los participantes informaron tener menos de un año de laborar en este tipo de negocios y el 10% de 11 a 15 años. En cuanto a estudios, los fumigadores mencionaron tener estudios básicos (primaria) y el 52.5%, estudios a nivel superior.

En la **Tabla 7** se presentan los principales resultados en cuanto a síntomas que mencionaron tener los fumigadores, entre ellos están dolor de cabeza, sed, ardor en ojos, dolor de estómago y espasmo o tic en párpados. Con menor frecuencia refirieron otros síntomas como visión borrosa, sensibilidad y molestias ante la luz, entre otros.

Tabla 7. Principales signos y síntomas referidos por fumigadores urbanos

Síntoma	n/%
Dolor de cabeza	11/55
Sed	10/50
Ardor en ojos	7/35
Dolor de estómago	7/35
Tics en párpados	7/35
Visión borrosa	6/30
Sensible	5/25
Debilidad	5/25
Sensible	5/25
Molestia ante la luz	5/25
Palpitaciones en pecho	4/20
Flemas y tos sin razón alguna	4/20
Intranquilidad	4/20
Irritación de la garganta	4/20
Hormigueo	4/20
Molestias en piel	3/15
Músculos rígidos o tensos	3/15
Salivación excesiva	3/15
Escalofríos	3/15
Aceleración del pulso	3/15

En la **Tabla 8** se presentan las medidas preventivas utilizadas por los fumigadores para el buen uso y manejo de plaguicidas con base a la norma oficial mexicana (NOM 056-SSA-1993). Los resultados obtenidos muestran que el 21.0% de los trabajadores usa overol, 73.7% sombrero o gorra, 57.9% mascarilla, 10.5% cubrebocas, 5.3% careta, 36.8% guantes impermeables, 26.3% botas impermeables y el 31.6% lentes de seguridad.

Tabla 8. Frecuencia de uso de equipo de protección en fumigadores urbanos (n /%)

Equipo de protección	Nunca	Pocas veces	Mucha frecuencia	Siempre
Overol	14/73.68	1/5.26	-	4/21.05
Chaqueta impermeable	17/89.47	1/5.26	1/5.26	-
Pantalón impermeable	17/89.47	1/5.26	1/5.26	-
Sombrero o gorra	2/10.53	2/10.53	1/5.26	14/73.68
Mascarilla	6/31.58	4/21.05	1/5.26	8/57.89
Cubrebocas desechable	10/52.63	4/21.05	3/15.79	2/10.53
Pañuelo	16/84.21	2/10.53	1/5.26	-
Careta	13/68.42	5/26.32	-	1/5.26
Guantes impermeables	9/47.37	2/10.53	1/5.26	7/36.84
Botas impermeables	11/57.89	3/15.79	-	5/26.32
Lentes de seguridad	9/47.37	4/21.05	-	6/31.58

Actividad acetilcolinesterasa

Las medias geométricas de la concentración de Hb y la actividad AChE con y sin ajuste por Hb se presentan en la **Tabla 9**. Se encontraron promedios de 5.43 y 5.54 U/mL de AChE y 16.52 y 16.20 g/L de Hb en fumigadores y controles, respectivamente. La media geométrica de la actividad AChE ajustada en los fumigadores no fue estadísticamente diferente a la de los individuos control (32.3 U/g de Hb versus 33.9) (**Figura 9**). Resultados similares fueron encontrados por Jiménez y Schosinsky (2000), quienes realizaron un estudio en Costa Rica para obtener valores de referencia de la AChE, Hb y AChE ajustada tanto para hombres como para mujeres. En el trabajo referido se observaron promedios de 5.34 y 4.53 U/mL de AChE, 15.8 y 13.9 g/L de Hb, 33.9 y 32.9 U/g de Hb de AChE ajustada, respectivamente. Asimismo, Ortíz-Borrayo (2010) reportó actividades de 5.73 U/mL de AChE, 15.98 g/L de Hb y 35.86 U/g de Hb de AChE ajustada, en expendedores de plaguicidas de Nayarit.

La actividad de AChE ha sido evaluada en diversas poblaciones agrícolas, sin embargo, en la mayoría de los estudios los valores de AChE están ajustados por el valor de hematocrito, número de eritrocitos o volumen de muestra, lo que hace difícil la comparación de los datos obtenidos en este trabajo con lo reportado en la literatura.

Tabla 9. Medias geométricas de AChE (U/mL), Hb y AChE (U/g de Hb) de acuerdo al grupo de estudio

	Fumigadores		Controles		p
	GM	IC (95%)	GM	IC (95%)	
AChE U/mL	5.43	5.19-5.569	5.54	5.19-5.92	0.51
Hb g/dL	16.52	15.90-17.17	16.20	15.79-16.62	0.32
AChE ajustada U/g de Hb	32.29	30.38-4.31	33.96	31.70-36.37	0.22

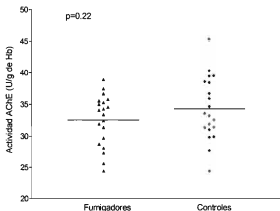


Figura 9. Actividad acetilcolinesterasa de acuerdo al grupo de estudio

En la **Tabla 10** se muestra la relación entre los principales síntomas referidos por los fumigadores urbanos y la actividad AChE. No hubo diferencias estadísticamente significativas en la media geométrica de AChE entre los participantes que presentaron y los que no presentaron los síntomas evaluados. Problemas de disminución en la atención verbal, memoria visual, motricidad y afectividad han sido demostrados en trabajadores expuestos a plaguicidas a través de cuestionarios neuroconductuales (Maroni et al., 1986). Existe evidencia de que un episodio de intoxicación con OF puede ocasionar un incremento en la prevalencia de síntomas de daño neurológico (Steenland et al., 1994).

Tabla.10. Principales síntomas con respecto a la actividad acetilcolinesterasa

Síntomas	Actividad acetilcolinesterasa (U/g Hb)		<i>p</i>
	Sí presentaron síntomas	No presentaron síntomas	
Dolor de cabeza	32.28	32.86	0.76
Sed	32.61	32.46	0.93
Ardor en ojos	32.38	32.62	0.90
Dolor de estómago	32.01	32.82	0.67
Tic en párpados	31.99	32.83	0.66
Visión borrosa	30.98	33.20	0.27

Los fumigadores urbanos presentaron una media geométrica de 4.21 años de laborar en este tipo de establecimientos. El 40% (n=8) de los fumigadores y el 35% (n=7) de los controles mencionaron tener el hábito de fumar. En lo referente al consumo de alcohol, el 100% (n=20) de los fumigadores y 95% (n=19) de los controles reportó consumir algún tipo de bebida alcohólica (Tabla 11).

Tabla 11. Tiempo de exposición y hábitos nocivos

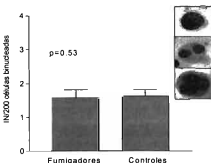
	Fumigadores	Controles
Tiempo de exposición	4.21	
(años)	(Rango 0.3-15)	
Fumadores	40% (n=8)	35% (n=7)
Consumo de alcohol	100% (n=20)	95% (n=19)

Antecedentes de cáncer

Entre los criterios de inclusión se consideró que los fumigadores urbanos no presentaran cáncer, sin embargo, se les cuestionó acerca de los familiares de línea directa (abuelos, papás, hermanos o hijos) que hubieran presentado dicha enfermedad. De acuerdo al grupo de estudio, el 40% (n=8) de los controles y el 40% (n=8) del grupo de fumigadores tuvieron antecedentes familiares de cáncer (p=1).

Índice nuclear

La **Figura 10** muestra que el promedio del IN fue de 1.60 en el grupo de fumigadores y 1.55 en controles, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (p=0.41). Estos datos no coinciden con diversos estudios en los que reportan un IN menor en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas (Lucero et al., 2000; Bhalli et al., 2006; Kehdy et al., 2007; Ali et al., 2008). Por otro lado Figs et al. (2000) y Lara-Montoya (2010) reportaron un IN mayor en una población expuesta al herbicida 2,4 dicloro fenoxiacético y en trabajadores de expendios de plaguicidas en Nayarit, respectivamente. Al parecer la exposición a plaguicidas puede modular positiva y negativamente la proliferación celular, esto dependerá del tipo de plaguicida y de la magnitud de exposición.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Figura 10. Índice nuclear de acuerdo al grupo de estudio

Micronúcleos

Los fumigadores presentaron un promedio de 12.1 MN/1000 células binucleadas y el grupo control de 5.9, estas diferencias fueron significativas (Figura 12). El control positivo (tratamiento con MMC) presentó 17 MN/1000 células binucleadas.

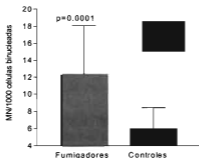


Figura 11. Frecuencia de MN/1000 células binucleadas de acuerdo a los grupos de estudio.

Los resultados obtenidos en este trabajo no concuerdan con lo reportado en otros estudios en los que no se ha observado un aumento en la presencia de MN en fumigadores. Venegas et al. (1998) evaluaron el número de MN en 22 fumigadores de la provincia de Concepción, Chile y en 16 individuos control. Los fumigadores tuvieron un promedio de 13.54 MN y los controles de 11.69. Los autores del trabajo antes mencionado, sugieren que la ausencia de genotoxicidad en los fumigadores, puede deberse a un programa por parte de las autoridades de salud, en el que se promueve las buenas prácticas en el uso y manejo de plaguicidas. Asimismo, Barbosa et al. (1994), realizaron un estudio en fumigadores (n=31) de Australia expuestos a fosfina y en un grupo control (n=21). Los trabajadores tuvieron un promedio de 6.9 MN y los controles de 7.1, sin que estas diferencias fueran estadísticamente significativas. Asimismo, Joksic et al. (1997) evaluaron la inducción de aberraciones cromosómicas, MN e intercambio de cromátidas hermanas en fumigadores agrícolas de Yugoslavia (actualmente Serbia). En ese estudio los fumigadores tuvieron un promedio de 5.41 MN y el grupo control de 5.09, sin haber

diferencias estadísticamente importantes. Sin embargo, los autores encontraron un mayor número de MN y de aberraciones cromosómicas en los fumigadores versus controles un mes después de que cesó la exposición a los plaguicidas.

Cabe mencionar que existen estudios realizados en otro tipo de trabajadores ocupacionalmente expuestos a plaguicidas, principalmente en agricultores, en los cuales no siempre se ha reportado una asociación significativa entre la exposición ocupacional a plaguicidas y los efectos genotóxicos. Pareciera que el daño al material genético depende de las condiciones en particular de cada población; grado de exposición determinado por el ambiente en el que se trabaja (espacio cerrado o abierto), tipo de plaguicidas que se utiliza, uso de equipo de protección, alimentación, factores económicos, sociales, culturales, susceptibilidad individual o poblacional, entre otros (Lucero et al., 2000; Ramírez y Cuenca., 2001; Pastor et al., 2001; Garaj-Vrhovac y Zeljezic 2002; Costa et al., 2006; Bhalli et al., 2006; Sailaja et al., 2006; Remor et al., 2009).

Por otro lado, los piretroides son los plaguicidas más utilizados por los fumigadores que participaron en este estudio. Diversos trabajos han reportado la capacidad mutagénica y genotóxica de estos compuestos. Al respecto, Surrallés et al. (1990) observaron un incremento en la frecuencia de MN en un estudio *in vitro* realizado en linfocitos de sangre periférica expuestos a fenvalerato, un insecticida piretroide (concentraciones de 10-50 µg/mL). También se ha observado un aumento en el número de MN en linfocitos tratados con mezclas de piretroides (Kocaman y Topaktaş, 2010).

La Tabla 12 muestra los resultados de los parámetros de genotoxicidad evaluados en la población de estudio con respecto a la media geométrica de AChE. De acuerdo con estos resultados, no hay un mayor número de MN, gemaciones, NBP, necrosis o apoptosis si los participantes tienen ≤ 33.4 U/g Hb de actividad de AChE, este valor corresponde a la mediana de AChE en la población de estudio.

Tabla 12. Comparación de los promedios de biomarcadores de daño genético con respecto al de la actividad AChE

Parámetros	Actividad acetilcolinesterasa		
	≤33.4	>33.4	p
Micronúcleos	6.57	8.70	0.33
Gemaciones	2.60	4.36	0.90
Puentes	2.47	2.06	0.60
Necrosis	1.00	1.68	0.94
Apoptosis	9.43	15.58	0.42
Donas	2.99	3.20	0.53

(n=40)

Apoptosis

En la Figura 12 se observa que el número de células en apoptosis fue significativamente mayor en los fumigadores con respecto a los controles ($p=0.0010$). Los resultados de este trabajo no concuerdan con los encontrados en un estudio realizado por Kehdy et al. (2007), en el que no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de apoptosis en células obtenidas de fumigadores de campañas de salud, con relación a un grupo control. La evaluación de este parámetro es de interés ya que puede estar relacionado con daño citotóxico (Fenech, 2007).

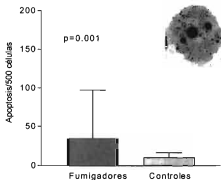


Figura 12. Apoptosis/500 células de acuerdo al grupo de estudio

Gemaciones

En la **Figura 13** se muestra que el promedio de gemaciones/1000 células binucleadas en los fumigadores (2.23) y en el grupo control (1.42) fue estadísticamente diferente. Las gemaciones representan un mecanismo por el cual la célula remueve amplificaciones de DNA, por lo que es considerado como un marcador de amplificaciones génicas (Fenech, 2003). El significado de este biomarcador no está claro pero se ha observado un mayor número de gemaciones en personas con cáncer (Shimizu et al., 1998).

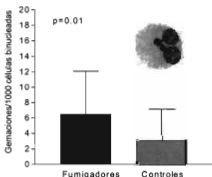


Figura 13. Número de gemaciones de acuerdo al grupo de estudio

Puentes nucleoplásmicos

La **Figura 14** muestra que el promedio de NBP en 1000 células binucleadas en los fumigadores (2.3 ± 2.5) y en el grupo control (0.9 ± 1.33) fue estadísticamente diferente ($p=0.049$). Los NBP se originan cuando los centrómeros de cromosomas dicéntricos o las cromátidas son llevadas hacia polos opuestos de la célula durante la anafase (Fenech y Crott, 2002).

Los datos encontrados en este trabajo coinciden con los reportados por Kehdy et al. (2007) en fumigadores de Brasil (4.59 ± 0.76), quienes tuvieron un incremento significativo de NPB con respecto a un grupo control (1.00 ± 0.34). Así mismo Zeljezic et al. (2007) encontraron mayor número de NBP en trabajadores (9.5 ± 0.7) de una fábrica de carbofuran, un plaguicida carbámico, con respecto a un grupo de referencia (3.6 ± 0.49). Sin embargo, existen estudios en los que no se ha encontrado esta asociación, Coskun et al. (2011) en una población agrícola no observaron diferencias en la frecuencia de NBP (0.50) con respecto a un grupo control (0.27).

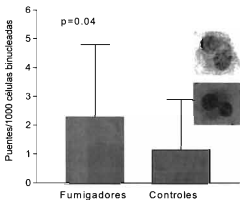


Figura 14. Puentes nucleoplásmicos de acuerdo al grupo de estudio

Necrosis

El promedio de células en estado de necrosis fue de 0.35 y 0.11 en fumigadores y controles, respectivamente, éstas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 15). La presencia de células en estado de necrosis, al igual que las células en apoptosis son utilizadas como un indicador de daño citotóxico (Fenech, 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo son diferentes a lo reportado por Kheddy et al. (2007), quienes reportaron un mayor promedio de necrosis en fumigadores (12.07) comparado con el grupo control (5.19).

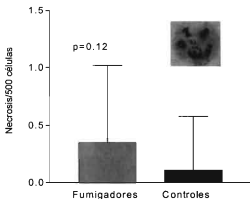


Figura 15. Necrosis/500 células de acuerdo al grupo de estudio

Núcleos en forma de donas

En la Figura 16 se observa que los fumigadores presentaron un promedio de 1.55 núcleos en forma de donas y en los controles un promedio de 2.7, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. No se conoce las implicaciones que pueda tener la presencia de este tipo de núcleos, pero se ha observado una alta frecuencia de este tipo de núcleos en personas con cáncer.

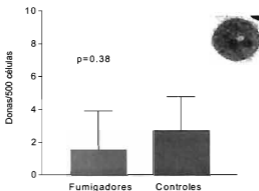


Figura 16. Donas/500 células de acuerdo al grupo de estudio

Polimorfismo PON1 192 en fumigadores urbanos

En la Figura 17 se presentan las frecuencias genotípicas de PON1192. El genotipo QR fue el que se encontró con mayor frecuencia en la población (63.16), seguido del genotipo RR (21.05) y QQ (15.79).

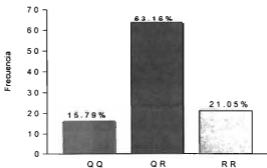


Figura 17. Frecuencias genotípicas de PON1 192

Relación del genotipo de PON1 192 y la presencia de biomarcadores de daño genético

En la **Tabla 13** se presentan los promedios de los biomarcadores de daño genético evaluados, de acuerdo a los genotipos de PON1. Los resultados muestran que los fumigadores homocigotos para el alelo Q, tuvieron una mayor frecuencia de apoptosis, NPB, necrosis y donas, con respecto a los homocigotos para el alelo RR, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 13. Biomarcadores de daño genético de acuerdo al genotipo de PON1

Parámetros de genotoxicidad	Genotipo de PON1 192 (Promedio/Desviación estándar)			p
	PON1 QQ	PON1QR	PON1RR	
Micronúcleos	9.33±3.51	13.5±5.94	9.75±6.70	0.38
Apoptosis	111±163.71	19.5±9.70	20.75±11.89	0.90
Gemaciones	8±7.54	7.3±5.79	2.66±1.15	0.33
Puentes	3.66±3.21	2.4±2.71	3±1	0.59
Necrosis	1±1	0.25±0.62	0±0	0.09*
Donas	2±3.46	1.83±2.58	0.5±1	0.71
Índice nuclear	1.55±0.28	1.60±0.25	1.42±0.39	0.65

*Marginalmente significativo.

Existen antecedentes en la literatura que sugieren la importancia del genotipo de PON1 como modulador de los efectos adversos ocasionados por plaguicidas. Al respecto, Rojas et al. (2009) en un estudio en linfocitos tratados con el plaguicida OF paratión, reportaron que los linfocitos de individuos que portaban el genotipo QQ presentaron mayor número MN con respecto al grupo control. Asimismo, en una población ocupacionalmente expuesta a plaguicidas en Brazil se encontró un incremento significativo en la frecuencia de MN (promedio de 8.44) en los individuos con el genotipo QQ (baja actividad enzimática), en contraste con los individuos con el genotipo RR (alta actividad enzimática) (promedio de 6.23) (da Silva et al., 2008). Una posible explicación del por qué en el presente trabajo no se observó una participación del polimorfismo PON1 192 como modulador de los efectos genotóxicos, pudiera ser el que los fumigadores de este trabajo están expuesto principalmente a plaguicidas piretroides y la enzima PON1 no tiene una participación en la biotransformación de estos xenobióticos.

Un aumento en el número de MN se ha asociado en algunos estudios con factores como edad, consumo de tabaco y alcohol (Fenech, 2007). En la **Tabla 14** se muestran los resultados de regresión lineal entre los parámetros citogenéticos estudiados y algunas posibles variables confusoras, por grupo de estudio y en la población en general. De acuerdo a los datos obtenidos, los MN en el grupo control no se asociaron con el consumo de tabaco o alcohol, sin embargo, en los fumigadores la intensidad de fumar estuvo asociada con el número de MN, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.01$). Aunque estadísticamente marginal, el mismo efecto se observó en los fumigadores que consumen alcohol ($p=0.08$). Lo anterior pudiera deberse a un efecto sinérgico de la co-exposición a plaguicidas y a otros xenobióticos. Estos datos son muy importantes ya el 40% de los participantes de este estudio reportaron tener el hábito de fumar. En cuanto a la presencia de gemaciones, se observó que en el grupo control la presencia de este biomarcador estuvo asociado con el índice de fumar; mientras que en los fumigadores se asoció con la edad y con el tiempo de exposición (años de laborar como fumigadores). Cuando se realizó el análisis de la población total, se observó que el índice de fumar está asociado con la presencia de gemaciones.

Por otra parte, la presencia de puentes nucleoplásmicos se asoció con el consumo de alcohol en los fumigadores, esta asociación permaneció cuando se analizó la población total. Asimismo, sólo en los controles, el IN se asoció con la edad, es decir conforme aumenta la edad disminuye la capacidad de los linfocitos de proliferar, este efecto se observó cuando se analizó a la población en general.

Tabla 14. Regresión lineal entre parámetros de genotoxicidad y algunas variables

	Controles		Fumigadores urbanos		Población total	
	β	p	β	p	β	p
	<u>MN</u>					
Edad	0.094	0.07	0.090	0.47	0.092	0.17
Tiempo de exposición	-	-	-0.049	0.87	-0.049	0.87
Hábito de fumar	0.593	0.61	4.193	0.11	2.409	0.09*
Índice de fumar*	0.013	0.28	0.108	0.04*	0.024	0.13
Consumo de alcohol	-0.014	0.94	-0.838	0.08	-0.417	0.10
Genotipo de PON1	-	-	-0.151	0.94	-0.151	0.94
	<u>Puentes</u>					
Edad	-0.010	0.60	-0.000	0.81	-0.007	0.58
Tiempo de exposición	-	-	0.042	0.41	0.042	0.41
Hábito de fumar	-1.000	0.01*	0.196	0.68	-0.461	0.13
Índice de fumar	-	-	0.000	0.98	0.000	0.99
Consumo de alcohol	-0.053	0.46	-0.161	0.04*	-0.101	0.05
Genotipo de PON1	-	-	-0.378	0.31	-0.378	0.31
	<u>Gemaclones</u>					
Edad	0.018	0.44	0.054	0.02*	0.035	0.04*
Tiempo de exposición	-	-	0.084	0.13	0.084	0.13
Fumar	-0.575	0.28	-0.535	0.38	-0.557	0.15
Índice de fumar	0.007	0.01*	0.031	0.24	0.007	0.03*
Consumo de alcohol	0.056	0.54	-0.050	0.63	0.009	0.89
Genotipo de PON1	-	-	-0.340	0.48	-0.340	0.48
	<u>IN</u>					
Edad	-0.011	0.01*	-0.0007	0.18	-0.0009	0.00*
Tiempo de exposición	-	-	-0.003	0.79	-0.003	0.79
Fumar	-0.156	0.14	-0.156	0.23	-0.156	0.05
Índice de fumar	-0.000	0.90	-0.0001	0.56	-0.000	0.75
Consumo de alcohol	-0.009	0.60	0.005	0.81	-0.002	0.89
Genotipo de PON1	-	-	-0.077	0.48	-0.077	0.48

* = Años fumando x cigarrillos por día

Expresión génica

En el ensayo de microarreglos, las muestras de los fumigadores se marcaron con Alexa 647 (verde) y las de los controles con Alexa 555 (rojo). A la par, se realizó un microarreglo control (swap), donde las muestras se marcaron a la inversa. Todos aquellos puntos rojos o naranjas, se interpretaron como genes que disminuyeron su expresión, mientras que los puntos verdes o tonalidades entre el amarillo y el verde son aquellos genes que aumentaron su expresión. Finalmente los puntos amarillos representan a los genes que en ambas condiciones se expresan igual (**Figura 18**).

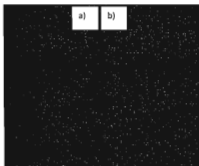


Figura 18. Esquema que muestra el resultado del análisis de microarreglos (a) junto con el experimento control (b).

En total se analizaron 35 mil genes, para lo cual se utilizó el programa Gene Sure®. Los valores que tomaron valor de 1 se consideraron como confiables y los menores a 1 se descartaron. Posteriormente se analizó la función en la que estaban involucrados los genes que mostraron alteración en su expresión, esto mediante el programa KEGG® (Kyoto Encyclopedia de Genes y Genomas). 1,656 genes mostraron alteración en su expresión (**Figura 19**). Se encontraron 208 genes reprimidos (**Tabla 15**) y 78 genes sobreexpresados (**Tabla 16**).

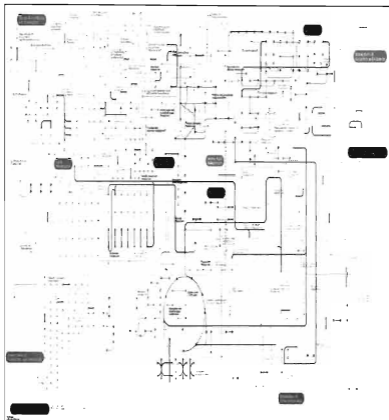


Figura 19. Mapa general de la expresión génica de los fumigadores urbanos con relación al grupo control

Tabla 15. Genes reprimidos en linfocitos de fumigadores

Número de genes reprimidos	Proceso biológico o enfermedad en la que se encuentra involucrado el gen
43	Vías metabólicas
24	Vías del cáncer
15	Via de la señalización de las cinasas
12	Regulación de la actina en el citoesqueleto
8	Ciclo celular
8	Alzheimer
8	Lupus eritematoso sistémico
6	Melanoma
6	Metabolismo de purinas
6	Interacción citocina-citocina
6	Natural killer mediadoras de la citotoxicidad
6	Cáncer de páncreas
6	Vías de la señalización de calcio
5	Metabolismo de pirimidinas
5	Cáncer colorectal
5	Vías de la señalización de TGF beta
5	Parkinson
5	Cáncer renal
5	Cáncer de próstata
4	Ubiquitina mediadora de la proteólisis
4	Via de señalización del receptor de células T
4	Via de señalización del receptor de células B
4	Leucemia mieloide crónica
3	Replicación de DNA
3	Cáncer de tiroides
2	Leucemia mieloide aguda

Tabla 16. Genes sobreexpresados en linfocitos de fumigadores

Número de genes sobreexpresados	Proceso biológico o enfermedad en la que se encuentra involucrado el gen
17	Vías metabólicas
10	Vías del cáncer
6	Interacción citocina-citocina
5	Regulación de la actina en el citoesqueleto
4	Vías de la señalización de TGF beta
4	Metabolismo de purinas
3	Lupus eritematoso sistémico
3	Carcinoma de células basales
3	Natural killer mediadoras de la citotoxicidad
2	Ciclo celular
2	Vía de las pentosas
2	Cáncer renal
2	Melanoma
2	Ubiquitina mediadora de la proteólisis
2	Cáncer de próstata
2	Vía de señalización del receptor de células T
2	Fosforilación oxidativa
2	Vía señalización por P53
1	Metabolismo de pirimidinas
1	Metabolismo de drogas
1	Cáncer de tiroides
1	Cáncer de endometrio
1	Reparación por excisión de nucleótidos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT



SISTEMA DE BIBLIOTECAS

Se realizó un análisis de confiabilidad mediante el software GeneSure®, que consistió en seleccionar los genes con un valor menor al 15% de confiabilidad, como referencia se consideró el nivel de expresión en base al log10. Los resultados sugieren una regulación negativa en la mayoría de los genes.

Los genes se ordenaron en forma descendente en base a su valor de expresión (log10). Se seleccionaron los 50 genes que tuvieron la mayor diferencia en expresión, dentro de los cuales se encuentran algunos involucrados en diferentes tipos de cáncer, ciclo celular y vías de señalización (**Figura 20**).

Existen estudios donde se evaluó la expresión génica con respecto a la exposición de diversos plaguicidas. Mense et al. (2006) realizaron un estudio en astrocitos humanos expuestos a cyflutrin y clorpirifos y encontraron genes sobre regulados, como el interferon gamma, vías de señalización de insulina, cinasas, vía de activación de astrocitos células gliares, dicha activación de los astrocitos pudiera ser un mecanismo importante sobre la neurotoxicidad de ambos plaguicidas. Stapleton et al. (2009) mediante el análisis de microarreglos de DNA en ratas expuestas a clorpirifos reportaron alteraciones en la expresión de 277 genes, dentro de los cuales se encontraron genes reprimidos como el TGF β , así como genes involucrados en la vía de la señalización de las cinasas. Los perfiles de expresión génica en este estudio representan una respuesta adaptativa, procesos de reparación y eventos apoptóticos.

De acuerdo a los resultados y los antecedentes de la literatura, se considera que el gen que codifica para el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β) pudiera ser un gen candidato para futuras investigaciones en donde se evalúe la asociación entre la exposición a plaguicidas y el desarrollo de cáncer.

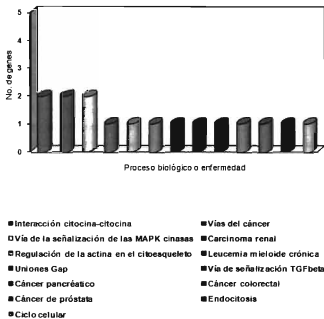


Figura 20. Genes que mostraron una mayor diferencia en su expresión en los fumigadores con respecto al grupo control

8. CONCLUSIONES

- Los piretroides son los plaguicidas más frecuentemente utilizados en las fumigaciones urbanas, seguidos de cumarinas y organofosforados.
- La actividad acetilcolinesterasa no fue estadísticamente diferente en los grupos de estudio.
- El índice de división nuclear no fue estadísticamente significativo en los grupos de estudio.
- Los fumigadores urbanos tuvieron un aumento significativo en el número de micronúcleos, puentes nucleoplásmicos y gemaciones con respecto al grupo control.
- Se observó una mayor frecuencia de células apoptóticas pero no de células necróticas en los fumigadores con respecto a los controles, lo cual puede sugerir un daño citotóxico.
- No se observaron diferencias en los parámetros citogenéticos en la población de estudio de acuerdo a los genotipos de PON1.
- El fumar se asoció de manera significativa con la presencia de micronúcleos en los fumigadores urbanos.
- La frecuencia de gemaciones en los fumigadores se asoció con la edad y con el tiempo de exposición de manera significativa.
- Los 1,656 genes mostraron una expresión génica diferencial entre los grupos de estudio.
- Entre los genes con mayor diferencia en su expresión, se encuentran algunos involucrados en ciclo celular y vías de señalización.
- Dentro de los genes que presentaron mayor modificación en la expresión, se encuentran siete relacionados con diferentes tipos de cáncer.
- Se sugiere que el gen que codifica para el factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- β 1) pudiera ser un gen candidato para futuras investigaciones sobre la asociación entre la exposición a plaguicidas y el desarrollo de cáncer.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alavanja M.C., Dosemeci M., Samanic C., Lubin J., Lynch C.F., Knott C., Barker J., Hoppin J.A., Sandler D.P., Coble J., Thomas K., Blair A. (2004). Pesticides and lung cancer risk in the agricultural health study cohort. *American Journal of Epidemiology*. 160:876-885.
- Ali T., Bhalli J.A., Rana S.M., Khan Q.M. (2008). Cytogenetic damage in female Pakistani agricultural workers exposed to pesticides. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 49:374-380.
- ATSDR (2002). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. 395 pp.
- ATSDR (2003). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids. 287 pp.
- Barbosa A y Bonin A.M. (1994). Evaluation of phosphine genotoxicity at occupational levels of exposure in New South Wales, Australia. *Occupational and Environmental Medicine*. 51:700-705.
- Bhalli J., Khan Q.M., Haq M.A., Khalid A.M., Nasim A. (2006). Cytogenetic analysis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticides in a pesticide production industry. *Mutagenesis*. 21:143-148.
- Bolognesi C., Perroni E., Landini E. (2001). Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis*. 17: 391-397.
- Bolognesi C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research*. 543:251-272.
- Bolognesi C., Creus A., Ostrosky-Wegman P., Marcos R. (2011). Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis*. 26:19-26.
- Boyum A. (1968). Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 97:31-50.
- Brown P.O y Botstein D. (1999). Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics*. 21: 33-37.
- Brown A.E. (2006). Mode of Action of Structural Pest Control Chemicals. Coordinator Pesticide Education and Assessment Programs. Pesticide Information Leaflet No. 41. Department of Entomology. College Park. 1-8 pp.

- Carreno J., Rivas A., Granada A., Lopez-Espinosa M., Mariscal M., Olea N., Olea-Serrano F. (2007). Exposure of young men to organochlorine pesticides in Southern Spain. *Environmental Research*. 103:55-61.
- CESAVEJAL. (2003). Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Jalisco. *Inocuidad Alimentaria*. 360 pp.
- Cherry N.M., Mackness M., Durrington P. (2002). Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill-health to sheep dip. *Lancet*. 359:763-764.
- COFEPRIS (2004). Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. *Catalogo de plaguicidas*. México. [Consultado diciembre de 2010]. <http://www.cofepris.gob.mx/bv/libros.htm>.
- Coskun M., Cayir A., Ozdemir O. (2011). Frequencies of micronuclei (MNI), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Çanakkale, Turkey. *Environment International*. 37:93-96.
- Costa L.G., Ritcher R.J., Li W.F., Cole T., Guizzetti M., Furlong C. (2002). Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomarkers*. 8:1-12.
- Costa L.G., Cole T., Vitalone A., Furlong C. (2005). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta*. 352:37-47.
- Costa C., Teixeira J.P., Silva S., Roma-Torres J., Coelho P., Gaspar J., Alves M., Laffon B., Rueff J., Mayan O. (2006). Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*. 21:343-50.
- da Silva J., Moraes C.R., Heuser V.D., Andrade V.M., Silva F.R., Kvitko K., Emmel V., Rohr P., Bordin D.A., Andreazza A.C., Salvador M., Joao A., Henriques P., Erdtmann B. (2008). Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23:415–422.
- Davies H.G., Ritcher R. J., Keifer M., Broomfield C.A., Sowalla J., Furlong C.E. (1996). The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman y sarin. *Nature Genetics*. 14:334-336.

- Eastmond D.A., Tucker J.D. (1998). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis*.13:34-43.
- EPA (2008). Agencia de Protección al Ambiente de Estados Unidos. Pesticidas. [Consultado diciembre 2010]. Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.
- Felsenfeld G y Groudine M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*.42:448-453.
- Fenech M., Bonassi S., Tumer J., Lando C., Ceppi M., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., Zeiger E., Bigatti M.P., Bolognesi C., Cao J., De Luca G., Di Giorgio M., Ferguson L.R., Fucic A., Lima O.G., Hadjidekova V.V., Hrelia P., Jaworska A., Joksic G., Krishnaja A.P., Lee T.K., Martelli A., McKay M.J., Migliore L., Mirkova E., Muller W.U., Odagiri Y., Orsiere T., Scarfi M.R, Silva M.J., Sofuni T., Surrallés J., Trenta G., Vorobtsova I., Vral A., Zijno A. (2003). Human Micronucleus project. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research*. 534:65-75.
- Fenech M. (2000).The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*.455:81-95.
- Fenech M y Crott JW. (2002). Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds Induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutation Research*. 504:131-136.
- Fenech M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*. 2:1084-1104.
- Figgs L.W., Holland N.T., Rothman N., Zahm S.H., Tarone R.E., Hill R., Robert F., Vogt R.F., Smith M.T., Boysen C.D., Holmes F.F., VanDyck K., Blair A. (2000). Increased lymphocyte replicative index following 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide exposure. *Cancer Causes Control*. 11: 373-380.
- Garaj-Vrhovac V., Zeljezic D. (2002). Assessment of genome damage in a population of croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *Journal of Applied Toxicology*. 22: 249-255.

- González-Arias C.A., Robledo-Marenco M.L., Medina-Díaz I.M., Velázquez-Fernández J.B., Girón-Pérez M.I., Quintanilla-Vega M.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*. 26:221-228.
- Gwinn M.R y Weston A. (2008). Application of Oligonucleotide Microarray Technology to Toxic Occupational Exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 71:315-324.
- Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 45:51-88.
- Humbert R., Adler D.A., Distèche C.M., Hassett C., Omiecinski C.J., Furlong C.E. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nature Genetics*. 3:73-76.
- Jiménez M y Schosinsky K. (2000). Valores de referencia de colinesterasa plasmática y eritrocítica en población costarricense. Comparación del desempeño clínico de ambas enzimas. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 21:3-4.
- Jones P.A y Baylin S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 3:415-428.
- Joksić G., Vidaković A., Spasojević-Tisma V. (1997). Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environmental Research*. 75:113-118.
- Kehdy F., Cerqueira E., Bonjardim M., Camelo R., Castro M. (2007). Study of the cytogenetic effects of occupational exposure to pesticides on sanitation workers in Belo Horizonte, Brazil. *Genetic and Molecular Research*. 6:581-593.
- Keifer M.C y Firestone J. (2007). Neurotoxicity of pesticides. *Journal of Agromedicine*. 12:17-25.
- Kelce W.R., Gray L.E., Wilson E.M. (1998). Antiandrogens as environmental endocrine disruptors. *Reproduction Fertility and Development*. 10:105-111.
- Kocaman A.Y y Topaktaş M. (2010). Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and alpha-cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental Toxicology*. 25:157-68.

- Lara-Montoya M.S. (2010). Determinación de micronúcleos en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Nayarit, pp 37.
- Lee B.W., London L., Paulauskis J., Myers J., Christiani D.C. (2003). Association between human paraoxonase gene polymorphism and chronic symptoms in pesticide-exposed workers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 45:118-122.
- Lima A y Vega L. (2005). Methyl-parathion and organophosphorous pesticide metabolites modify the activation status and interleukin-2 secretion of human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters*. 158:30-38.
- Li E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*. 3:662-673.
- Lucero L., Pastor S., Suárez S., Durbán R., Gómez C., Parrón T., Creus A, Marcos R. (2000). Cytogenetic biomonitoring of spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. *Mutation Research*. 464:255-262.
- Luque J y Herráez A. (2001). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética. Ed. Harcourt, España, 469 pp.
- Mackness B., Davies G.K, Turkie W., Lee E., Roberts D.H, Hill E., Roberts C., Durrington P.N., Mackness M.I. (2001). Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype?. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 21:1451-1457
- Maroni. M. (1996). Indicadores biológicos para la valoración de la exposición humana a compuestos químicos industriales: Plaguicidas carbamatados. Generalitat Valenciana. 67 pp.
- Maroni M., Colosio C., Ferrioli A., Falt A. (2000). Biological monitoring of pesticide exposure: a review. Chapter 1: Organophosphate pesticides. *Toxicology*. 143:1-118.
- Mattiuazzo M., Fiore M., Ricordy R., Degrassi F. (2006). Aneuploidy-inducing capacity of two widely used pesticides. *Carcinogenesis*. 27:2511-2518.
- Mense S.M., Sengupta A., Lan C., Zhou M., Bentsman G., Voisky D.J., Whyatt R.M., Perera F.P., Zhang L. (2006). The common insecticides cyfluthrin and

chlorpyrifos alter the expression of a subset of genes with diverse functions in primary human astrocytes. *Toxicological Sciences*. 93:125-135.

Moreno-Grau M.D. (2003). *Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. Ed. Mc Graw Hill. 370 pp.

NCBI. (2007). National Center for Biotechnology. Microarrays. (Consultado Enero de 2011). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>.

NOM-056-SSA1. (1993). Norma Oficial Mexicana. Requisitos sanitarios del equipo de protección personal.

Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/056ssa13.html>. Consultado Julio de 2010.

Nelson D. (2002). Cytochrome P450s in humans. [Consultado Agosto de 2008]. Disponible en: <http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>

OMS (2004). Organización Mundial de la Salud. Prevención de los riesgos para la salud derivados del uso de plaguicidas en la agricultura. [Consultado Enero de 2011]. Disponible en: http://www.who.int/occupational_health/publications/en/pwh1sp.pdf.

Ortiz-Borrayo L.Y. (2010). Determinación de la actividad acetilcolinesterasa y del polimorfismo genético CYP2D6*4 en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas.

Padilla S., Buzzard J., Moser V.C. (2000). Comparison of the Role of Esterases in the Differential Age-Related Sensitivity to Chlorpyrifos y Methamidophos. *Neurotoxicology*. 21: 49-56.

Pastor S., Gutiérrez S., Creus A., Xamena N., Piperakis S., Marcos R. (2001). Cytogenetic analysis of Greek farmer using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 16:539-545.

Primo-Parmo S.L., Sorenson R.E., Teiber J., La Du B.N. (1996). The human serum paraoxonasa/arylesterase gene (PON1) is a member of a multigene family. *Genomics*. 33:498-509.

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

Ramírez V y Cuenca P. (2001). Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Biología Tropical*. 49:1-8.

- Ramírez J., Chávez L., Santillán J.L., Guzmán S. (2003). Microarreglos de DNA. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México. Mensaje Bioquímico 27:97-120.
- Recillas T y Escamilla M. (2004). Participación de la estructura de la cromatina en la regulación de la expresión génica. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México. Mensaje Bioquímico 28:173-201.
- Remor A.P., Totti C.C., Moreira D.A., Dutra G.P., Heuser V.D., Boeira J.M. (2009). Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environment International*. 35:273-278.
- Rivero M.B y González F.J. (2001). Daños a la salud por plaguicidas. Ed. Manual Moderno, México, 487 pp.
- Rojas-García A.E., Sordo M., Vega L., Quintanilla-Vega B., Solis-Heredia M., Ostrosky-Wegman P. (2009). The role of paraoxonase polymorphisms in the induction of micronucleus in paraoxon-treated human lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 50:823-829.
- Sailaja N., Chandrasekhar M., Rekhadevi P.V., Mahboob M., Rahman M.F., Vuyyuri S.B., Danadevi K., Hussain S.A., Grover P. (2006). Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. *Mutation Research*. 609:74-80.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. (1995). "Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray", *Science*, 270:467-470.
- Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. (1998). Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*. 140:1307-1320.
- Suheiro T., Nakamura T., Inoue M., Shinoki T., Ikeda Y., Kumon Y., Shindo M., Tanaka H., Hashimoto K. (2000). A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis*. 150:295-298.
- Surrallés J., Carbonell E., Puig M., Xamena N., Creus A., Marcos R. (1990). Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvalerate in cultured human lymphocytes. *Toxicology Letters*. 54:151-155.

- Stapleton A.R y Chan V.T. (2009). Subtoxic chlorpyrifos treatment resulted in differential expression of genes implicated in neurological functions and development. *Archives of Toxicology*, 83:319-33.
- Steenland K., Jenkins B., Ames R., O'Malley M., Chrislip D. y Russo J. 1994. Chronic neurological sequelae to organophosphates pesticide poisoning. *American Journal of Public Health*.84:731-736.
- Venegas W., Zapata I., Carbonell E., Marcos R. (1998). Micronuclei analysis in lymphocytes of pesticide sprayers from Concepción, Chile. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*.18:123-9.
- Wigle D.T., Arbuckle T.E., Turner M.C., Bérubé A., Yang Q., Liu S., Krewski D. (2008). Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 11:373-517.
- Worek F., Mast U., Kiderten D., Diepold C., Eyer P. (1999). Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*. 288:73-90.
- Zeljetic D., Vrdoljak L.V., 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.

UNIVERSIDAD DE AYTÓN



SISTEMA DE BIBLIOTECAS