

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



Evaluación de la exposición a plaguicidas y su implicación en la metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53* en jornaleros indígenas huicholes

PRESENTA

M. en C. Diana Marcela Paredes Céspedes

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Ambientales

DIRECTORA

Dra. Yael Yvette Bernal Hernández

CODIRECTORA

Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco

Tepic, Nayarit, junio de 2019

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental, de la Universidad Autónoma de Nayarit, bajo la dirección de la Dra. Yael Yvette Bernal Hernández y la codirección de la Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco y con financiamiento del proyecto CONACyT-262284

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento muy especial para la directora del presente proyecto, Dra. Yael Yvette Bernal Hernández quien desde un comienzo confió en mi para el desarrollo del mismo y por el cual me siento muy afortunada de formar parte. Su disciplina y perseverancia han sido un gran ejemplo para mi durante toda mi estancia en el posgrado y ha sido un gusto para mi haber tenido la oportunidad de conocerla y de trabajar en conjunto, no solo en el aspecto académico sino también en el ámbito personal, en el cual también he sentido un gran apoyo de su parte en todo momento.

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Briscia Socorro Barrón Vivanco que siempre ha presentado una excelente disposición para atender cualquier duda o inquietud que ha surgido a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Asimismo, me siento muy afortunada de haber tenido la posibilidad de trabajar bajo su codirección durante el desarrollo del presente proyecto y de haber conocido a la gran persona que es.

Mis más sinceros agradecimientos para la Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, a quien me siento muy afortunada de conocer y de poder trabajar. Sin lugar a dudas ha sido una de las personas con mayor excelencia académica que he conocido a lo largo mi trayectoria profesional, además de ser una excelente persona. Gracias por todo su apoyo durante mi estancia en el laboratorio y su disposición para atenderme en cualquier inquietud o inconveniente que se me hubiera podido presentar.

Un gran agradecimiento para la Dra Irma Martha Medina Díaz, quien a sido un ejemplo para mí por demostrarme que un excelente investigador puede lograr un equilibrio en el tiempo dedicado al desarrollo profesional y personal. Gracias por todo el conocimiento brindado durante todo mi tiempo en el posgrado que sin lugar a dudas ha sido muy valioso.

Agradezco a la Dra. Cyndia Azucena González Arias, por todo su apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio, es una persona que siempre ha estado dispuesta

a escucharme y apoyarme en cualquier momento que lo he necesitado y ha sido un gran gusto para mi haber compartido este tiempo en el mismo grupo de investigación. Agradezco a la Dra. Laura Ortega Cervantes por todas las aportaciones realizadas durante el desarrollo del proyecto, las cuales han permitido fortalecerlo a través de cada avance de seminario.

Agradezco a la Dra. Betzabet Quintanilla Vega, por abrirme las puertas de su laboratorio para el desarrollo de uno de los objetivos del proyecto. Por siempre haber presentado la mejor disposición para el aprendizaje de la técnica y la excelente culminación de los resultados.

Agradezco a la Dra. Leticia Yañez Estrada, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio para el aprendizaje y el desarrollo de uno de los objetivos del presente proyecto.

Agradezco a la Dra. Isabel Alvarado Cruz, por todo el apoyo brindado para el aprendizaje en el desarrollo experimental de uno de los objetivos del presente proyecto.

Para Sandra Amezcua y Mayra Carreón Monroy, un muy sincero agradecimiento por todo el apoyo brindado durante toda mi estancia en el laboratorio y para el desarrollo del proyecto, ha sido un gran gusto para mi haberlas conocido y el tiempo compartido.

Un muy sincero y especial agradecimiento a mis queridos compañeros Carmen Xotlanihua, Fátima Murillo, Fidel Navarro, Néstor Ponce y Pako Herrera con quienes además de tener la oportunidad de compartir conocimientos y experiencias profesionales he entablado una grandiosa relación personal que perdurará por mucho más tiempo. Gracias por todo su apoyo incondicional durante mi estancia en el laboratorio y en este estado.

Agradezco a todos mis demás compañeros de posgrado y licenciatura que han entrado y salido del laboratorio durante mi estancia en la Universidad, por las experiencias compartidas y el apoyo recibido.

Agradezco inmensamente a mi mejor amiga y mi compañera de vida Nury Gineth Infante González, quien ha compartido conmigo gran parte de mi trayectoria académica y personal, por su ánimo y apoyo incondicional durante toda mi estadía en México, además de brindarme su valiosa amistad.

Agradezco a La Red Temática de Toxicología de Plaguicidas de CONACYT (clave 294303) por el apoyo brindado para el desarrollo de estancias de investigación y la presentación de los resultados obtenidos del presente estudio en congresos y simposios científicos nacionales e internacionales.

Agradezco a la coordinación del posgrado CBAP de la Universidad Autónoma de Nayarit por brindarme la oportunidad de ingresar al mismo y de fortalecer mis conocimientos, en especial al Doctor Diego García Paredes y a la Licenciada Mayra Pérez Covarrubias, quienes me han apoyado desde el ingreso al programa académico.

Al CONACYT por el apoyo financiero durante el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIAS

Este proyecto va dirigido a una de las personas más importantes de mi vida, mi madre Rubiela Céspedes Portela, quien por hoy es mi cimiento y la base de mi vida. Gracias por todo tu apoyo incondicional durante todas las etapas de mi vida, porque sin importar cual sea mi decisión nunca has dudado en apoyarme y en dejarme seguir mis deseos y metas. Tú presencia es mi mayor fuerza para superar cualquier situación adversa que se me haya podido presentar y siempre agradeceré infinitamente el hecho de que seas mi madre y el amor incondicional que me brindas día a día. ¡TE AMO Y AMARÉ POR SIEMPRE!

Con la misma importancia, se encuentra mi padre Hernán Miguel Paredes Muñoz quien ha sido un gran ejemplo para mí como hombre y ser humano. Gracias por brindarme siempre todo tu apoyo y amor inalcanzable. Siempre me he sentido muy orgullosa de tenerte en mi vida y aunque estemos separados físicamente el tenerte ha representado para mí una importancia vital en cada etapa que he atravesado. TE AMO CON TODO MI SER

Para mi querido hermanito Daniel Felipe Paredes Céspedes quien iluminó mi vida desde hace 23 años, a quien he visto crecer desde su llegada a este mundo y por quien he intentado ser el mejor ejemplo de hermana mayor, te agradezco infinitamente por estar presente en mi vida. Porque tu presencia es esencial para mí, saber que seguimos creciendo juntos y que nos respaldaremos por siempre en cualquier eventualidad que se nos pueda presentar. Eres un excelente ser humano y para ti no tengo más que desearte siempre lo mejor. TE AMO DESDE QUE SUPE QUE LLEGARÍAS A NUESTRA PEQUEÑA FAMILIA

Por último, pero con igual importancia se encuentra una persona con la que no comparto lazo de sangre pero que ha sido esencial en el desarrollo de este proyecto, ya que me ha acompañado desde mi primer experimento. ¡Para mi muy querido amigo Paki!, a quien en primera instancia me describieron como una persona muy loquita pero excelente ser humano, sin equivocarse. Sin lugar a dudas eres un excelente profesional, como muy pocos, eres una persona a la cual admiro muchísimo por tu entrega apasionada a cada cosa que realizas tanto a nivel profesional como personal, aún más admiro la gran persona que eres. Me siento sumamente afortunada de conocerte y de considerarte sin llegar a dudarlo como mi mejor amigo, un término que no utilizo con mucha frecuencia, pero que siento con mucha seguridad ante ti. TE ADORO Y TE CONSIDERO PARTE DE MI FAMILIA

RESUMEN

El uso indiscriminado de plaguicidas a nivel mundial ha generado graves problemas de salud pública, particularmente en jornaleros indígenas, quienes son potencialmente vulnerables a los efectos tóxicos de los plaguicidas, debido a la falta de conocimiento acerca de la toxicidad de estos compuestos, la falta de equipo de protección personal adecuado durante las jornadas laborales, así como factores propios de la etnia. Recientemente, se ha enfocado la atención en evaluar las posibles modificaciones epigenéticas, especialmente alteraciones del patrón de metilación del ADN tanto a nivel global como en genes específicos en poblaciones expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. Estos cambios pueden alterar la función del genoma y modificar los mecanismos específicos de toxicidad a ciertas sustancias; además, pueden persistir incluso en ausencia de los factores que las generaron. Dado que los cambios epigenéticos pueden ser transmitidos entre generaciones, evaluar estas modificaciones en poblaciones ocupacionalmente expuestas, como los indígenas huicholes, contribuiría a un mejor entendimiento sobre los efectos de los plaguicidas en estas poblaciones. El objetivo de estudio fue evaluar biomarcadores de exposición, efecto y metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53* en jornaleros indígenas huicholes. Se realizó un estudio transversal, descriptivo y analítico en 191 indígenas huicholes en dos periodos de tiempo diferentes. Las características generales y socioeconómicas de la población, dieta, hábitos nocivos (consumo de drogas, tabaco y alcohol), así como, la exposición a plaguicidas, síntomas relacionados con la exposición y el uso adecuado del equipo personal de protección, fueron evaluados a través de un cuestionario estructurado. Los participantes del estudio donaron muestra de sangre y orina para las diferentes determinaciones analíticas. Los parámetros clínicos fueron determinados en un laboratorio clínico certificado y las actividades acetilcolinesterasa (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE) fueron medidas espectrofotométricamente por el método de Ellman. La concentración de dialquilfosfatos (DAP) en orina se determinó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y la estimación de la metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53* se determinó por pirosecuenciación del ADN convertido con bisulfito de sodio. De acuerdo con los resultados, el 58.1% de la población fueron mujeres y 41.9% hombres con una edad promedio de 40 años. Se

observó que el 63.06% de la población presentó sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$) y el 56.02% afirmó consumir bebidas alcohólicas. Además, el 84.29% de la población total afirmó trabajar o haber trabajado en el campo, durante 8.2 años en promedio, 6 días a la semana y 6 horas diarias. Adicionalmente, el 90.28% de la población masculina afirmó utilizar plaguicidas y el 69% afirmó sembrar, cosechar, mezclar y aplicar plaguicidas. Los plaguicidas organofosforados, específicamente metamidofos y metil paratión fueron los más utilizados por la población, seguido de carbamatos (carbofuran y metomilo), glifosato y 2,4-D. Los síntomas asociados con exposición a plaguicidas, mencionados con mayor frecuencia fueron dolor de cabeza, mareo, debilidad y dolor de estómago. Se observó una alteración en el contenido eritrocitario y el porcentaje de hematocrito en ambos muestreos, y no se observaron diferencias en los parámetros de la fórmula blanca. Así también, se observó un incremento de glucosa, urea, BUN, creatinina y triglicéridos, así como una disminución de colesterol en el segundo muestreo. Las actividades AChE y BuChE estuvieron disminuidas durante el primer muestreo con respecto al segundo y los DAP encontrados en mayor proporción fueron DMTP (28.1 ng/mL) y DMP (10.6 ng/mL). No se observaron diferencias en la concentración de ΣDAP entre los jornaleros y los individuos que no trabajaron en el campo, por lo que se sugiere que la población está expuesta no sólo de forma ocupacional. El porcentaje de metilación para *p15* fue de 4.42 %5mC, para *p16* de 8.39 %5mC y 2.14 %5mC para *WRAP53*. No se observaron diferencias en el porcentaje de metilación de *p16* y *WRAP53*. Sin embargo, un aumento en la metilación de *p15* (4.48 %5mC) fue observada en los individuos que afirmaron haber trabajado en el campo, respecto a los que realizaban otras actividades (4.11%5mC), así como una correlación positiva entre el %5mC del gen *p15* y la edad. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren una posible alteración del patrón de metilación del gen *p15* por exposición a plaguicidas, sin embargo, son necesarios estudios adicionales que permitan conocer los efectos de la exposición a plaguicidas sobre el patrón de metilación de los genes analizados y sus implicaciones en la salud de los jornaleros indígenas huicholes.

ABSTRACT

The indiscriminate use of pesticides has generated serious public health problems, particularly in indigenous farmworkers, who are potentially vulnerable to the toxic effects of these compounds, due to lack of knowledge on the toxicity of these compounds and the lack of adequate personal protection during workdays, as well as factors proper to their ethnicity. Recently, attention has been focused on evaluating the possible epigenetic modifications, especially alterations in the methylation pattern of the DNA, at the global as well as in specific genes in pesticide-exposed populations. These changes can alter the functions of the genome and modify the mechanisms specific to the toxicity of certain substances. In addition, they can persist even in the absence of the factors that generate them. Given that epigenetic changes can be transmitted among generations, evaluating these modifications in occupationally exposed populations, such as that of indigenous Huicholes, would contribute to a greater understanding of the effects of pesticides on these populations. The objective of this study was to evaluate biomarkers of the exposure, effect, and methylation of the genes *p15*, *p16*, and *WRAP53* in indigenous Huichol farmworkers. We carried out a transversal, descriptive, and analytical study in 191 indigenous Huicholes during two periods at different times. The general and socioeconomic characteristics of the population, diet, harmful habits (consumption of drugs, tobacco, and alcohol), as well as exposure to pesticides, symptoms related with the exposure, and adequate use of personal protection equipment were evaluated by means of a structured questionnaire. The study participants donated a sample of blood and urine for the different analytical determinations. The clinical parameters were determined at a certified clinical laboratory, and the Acetylcholinesterase (AChE) and Butyrylcholinesterase (BuChE) activities were measured spectrophotometrically by the method of Ellman. The concentration of Dialkylphosphates (DAP) in urine was determined by gas chromatography with mass spectrometry, and the estimation of methylation of the genes *p15*, *p16*, and *WRAP53* was determined by the pyrosequencing of the DNA converted with sodium bisulfate. According to the results, 58.1% of the population were females and 41.9% were males, with an average age of 40 years. We observed that 63.06% of the population presented overweight (BMI ≥ 25 kg/m²) and 56.02% affirmed

consuming alcoholic beverages. In addition, 84.29% of the total population affirmed working or having worked in the fields, during an average of 8.2 years, 6 days weekly, and 6 hours daily. Additionally, 90.28% of the male population affirmed using pesticides and 69% affirmed seeding, harvesting, mixing, and applying pesticides. The organophosphorus pesticides, specifically methamidophos and methyl parathione, were those most utilized by the population, followed by the carbamates (Carbofuran and Methomyl), glyphosate, and 2,4-D. The symptoms associated with exposure to pesticides mentioned with greatest frequency were cephalgia, vertigo, weakness, and stomach ache. An alteration was observed in the erythrocytic content and in the hematocrit percentage in both samples, and no differences were observed in the parameters of the target formula. Also in this manner, we observed an increase of glucose, urea, BUN, creatinine, and triglycerides, as well as a diminution of cholesterol in the second sample. AChE and BuChE activities were diminished during the first sampling with respect to the second, and the DAP found in the greatest proportion were DMTP (28.1 ng/mL) and DMP (10.6 ng/mL). Differences were not observed in the concentration of Σ DAP between the day laborers and individuals who did not work in the fields, suggesting that the population not only in occupational form. The percentage of methylation for *p15* was 4.42%5mC, for *p16* it was 8.39%5mC, and it was 2.14%5mC for *WRAP53*. Differences in the percentage of methylation *p16* and *WRAP53* were not observed. However, an increase in the methylation of *p15* (4.48%5mC) was observed in individuals who affirmed having worked in the fields with respect to those who had engaged other activities (4.11%5mC), as well as a positive correlation between the %5mC of the gene *p15* and age. The data obtained in this work suggest a possible alteration of the methylation pattern of the *p15* gene due to exposure to pesticides; however, additional studies are necessary that permit knowing the effects of exposure to pesticides on the methylation pattern of the genes analyzed and their implications in for the health of indigenous farmworkers.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABLAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Jornaleros indígenas y exposición a plaguicidas.....	1
1.2 Vulnerabilidad de las comunidades indígenas huicholas por la exposición a plaguicidas.....	3
1.3 Uso de plaguicidas en Nayarit.....	5
1.4 Plaguicidas anticolinesterásicos más utilizados en el estado de Nayarit.....	6
1.5 Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas.....	9
1.5.1 Actividad de colinesterasas como biomarcadores de efecto y exposición a plaguicidas organofosforados.....	10
1.5.1.1 Acetilcolinesterasa.....	11
1.5.1.2 Butirilcolinesterasa.....	12
1.5.2 Dialquilfosfatos como biomarcadores de exposición a plaguicidas organofosforados.....	13
1.5.3 Metilación del ADN como biomarcador epigenético.....	14
1.5.3.1 Metilación gen específica.....	15
2 JUSTIFICACIÓN	18
3 HIPÓTESIS	18
4 OBJETIVO GENERAL	19
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5 METODOLOGÍA	20
5.1 Diseño del estudio.....	20
5.2 Determinaciones analíticas.....	21
5.2.1 Recolección y procesamiento de muestras.....	21
5.2.2 Determinación de la actividad acetilcolinesterasa en sangre total.....	22

5.2.3 Determinación de la actividad butirilcolinesterasa en plasma.....	23
5.2.4 Determinación de alquilfosfatos en muestras de orina.....	24
5.2.5 Estimación el porcentaje de metilación de genes involucrados en ciclo celular <i>p15</i> , <i>p16</i> y <i>WRAP53</i>	27
5.2.5.1 Extracción de ADN.....	27
5.2.5.2 Modificación con bisulfito de sodio.....	28
5.2.5.3 Amplificación por PCR.....	29
5.2.5.4 Pirosecuenciación.....	30
5.2.6 Análisis estadístico.....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Características generales de la población de estudio.....	33
6.2 Exposición a plaguicidas en la población de estudio.....	38
6.3 Parámetros clínicos en la población de estudio.....	45
6.4 Actividad de las colinesterasas en la población de estudio.....	53
6.4.1 Actividad acetilcolinesterasa.....	53
6.4.2 Actividad butirilcolinesterasa.....	56
6.5 Concentración de DAP como biomarcador de exposición a POF.....	58
6.6 Metilación de genes específicos (<i>p15</i> , <i>p16</i> y <i>WRAP53</i>).....	65
6.6.1 Gen <i>p15</i>	65
6.6.2 Gen <i>p16</i>	68
6.6.3 Gen <i>WRAP53</i>	70
6.6.4 Metilación de genes específicos, hábitos nocivos y dieta.....	75
6.7 Talleres sobre el uso de medidas de protección, manejo de plaguicidas y sus efectos en la población de estudio.....	76
7. CONCLUSIONES.....	79
8. PERSPECTIVAS.....	80
9. REFERENCIAS.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Población indígena del país y del estado de Nayarit.....	3
Figura 2. Biotransformación de clorpirifos.....	8
Figura 3. Esquema de la inhibición de la AChE por interacción con POF.....	12
Figura 4. Procedimiento realizado para la extracción de alquilfosfatos.....	26
Figura 5. Esquema de los sitios CpG analizados para los genes <i>p15</i> (a), <i>p16</i> (b) y <i>WRAP53</i> (c).....	32
Figura 6. Principales cultivos en los que trabaja la población de estudio.....	40
Figura 7. Frecuencia de principales plaguicidas utilizados por la población de estudio.....	41
Figura 8. Actividad AChE en la población de estudio del primer y segundo muestreo.....	54
Figura 9. Actividad BuChE en la población de estudio del primer y segundo muestreo.....	57
Figura 10. Comparación de la concentración de DAP entre la población que afirma trabajar en el campo y los individuos que realizan otras actividades.....	61
Figura 11. Correlación entre la cantidad de plaguicida roseado y Σ DEP en la población de estudio.....	62
Figura 12. Correlación entre el índice de masa corporal y Σ DEP en la población de estudio.....	63
Figura 13. Correlación entre la concentración de Σ DEP y el porcentaje de hematocrito en la población de estudio.....	64
Figura 14. Correlación entre la concentración de Σ DEP y los niveles de monocitos en la población de estudio.....	64
Figura 15. Metilación de los genes <i>p15</i> (a), <i>p16</i> (b) y <i>WRAP53</i> (c) en la población de estudio que trabaja en el campo y los individuos que realizan otras actividades	66
Figura 16. Correlación de la edad con la metilación del gen <i>p15</i> en la población de estudio.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de POF y sus correspondientes metabolitos dialquifosfatos...	14
Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación de ADN.....	29
Tabla 3. Primers utilizados para el proceso de pirosecuenciación.....	31
Tabla 4. Características generales de la población de estudio.....	33
Tabla 5. Características generales de la población de estudio por comunidad.....	36
Tabla 6. Frecuencia del sistema sanguíneo en la población de estudio.....	37
Tabla 7. Frecuencia de exposición en la población de estudio por sexo.....	39
Tabla 8. Patrón de plaguicidas utilizados por la población de estudio y su comparación con los recomendados por SAGARPA de acuerdo con los cultivos de la zona.....	43
Tabla 9. Uso del equipo de protección personal en la población de estudio de acuerdo al sexo.....	44
Tabla 10. Parámetros hematológicos en la población de estudio por muestreo...	46
Tabla 11. Parámetros de química sanguínea en la población de estudio.....	49
Tabla 12. Parámetros de química sanguínea en los individuos que participaron en ambos muestreos	50
Tabla 13. Parámetros del examen general de orina en la población de estudio...	52
Tabla 14. Concentración de alquifosfatos en orina de la población de estudio....	60
Tabla 15. Porcentaje de metilación por sitio del gen <i>p15</i> en la población de estudio.....	67
Tabla 16. Correlación entre los sitios analizados para el gen <i>p15</i>	67
Tabla 17. Metilación por sitio del gen <i>p16</i> en la población de estudio.....	69
Tabla 18. Correlación entre sitios analizados del gen <i>p16</i>	70
Tabla 19. Metilación por sitio del gen <i>WRAP53</i> en la población de estudio.....	71
Tabla 20. Correlación entre los sitios analizados del gen <i>WRAP53</i>	71

LISTA DE ABREVIATURAS

%5mC	Porcentaje de 5-metil citosina
%CG	Porcentaje de citosina guanina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BuChE	Butirilcolinesterasa
BUN	Depósito de nitrógeno ureico
CB	Carbamatos
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CpG	Citosina fosfato guanina
CYP450	Citocromo P450
DAP	Dialquilfosfatos
DCM	Diclorometano
DEDTP	Dietilditiofosfato
DEP	Dietilfosfato
DETP	Dietiltiofosfato
DETP-d10	Dietilfosfato deuterado
DMDTP	Dimetilditiofosfato
DMP	Dimetilfosfato
DMTP	Dimetiltiofosfato
DNMT	ADN metiltransferasas
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
Hb	Hemoglobina
Hex	Hexano
IMC	Índice de masa corporal
INK4	Inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina 4
LINE-1	Elementos nucleares intercalados largos
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MG	Media geométrica
PFBBrB	Bromuro de pentafluorobencilo
POF	Organofosforados
pRB	Proteína del retinoblastoma
PSQ	Pirosecuenciación
SMN	Proteína de supervivencia de motoneuronas
TETs	Proteínas de translocación
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UTR	Regiones no traducidas

1. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son sustancias o mezcla de éstas, destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier insecto, roedor, nematodo, hongo, maleza o cualquier forma de vida considerada como plaga (Azmi y Naqvi, 2011). Son compuestos ampliamente utilizados en diversos sectores, particularmente en el agrícola, ya que permiten mejorar el rendimiento y calidad de los cultivos (Damalas y Eleftherohorinos, 2011). Desde el año 1940, el control de diversas plagas se ha basado esencialmente en el uso masivo de plaguicidas sintéticos. Si bien, esto ha traído beneficios al área agropecuaria, el uso inadecuado de estos xenobióticos ha provocado importantes problemas de salud, y contaminación creciente del ambiente (Alvial, 2008).

Además, la falta de conocimiento de los efectos tóxicos de los plaguicidas, así como el uso inadecuado de equipo de protección personal durante las prácticas agrícolas, ha evidenciado la vulnerabilidad de las poblaciones ocupacionalmente expuestas a estos compuestos (Herrera-Moreno et al., 2018). Diversos estudios han evaluado los efectos en la salud de agricultores expuestos a plaguicidas o mezcla de éstos, así como la exposición a través de alimentos en la población no ocupacionalmente expuesta (Wilson y Tisdell, 2001; Maroni et al., 2006; Soares y Porto, 2009; Damalas y Eleftherohorinos, 2011).

1.1 Jornaleros indígenas y exposición a plaguicidas

Una población indígena se define como un grupo de identidad social y cultural propia, con gran apego al territorio ancestral, una producción orientada a la subsistencia y una lengua diferente a la nacional. De acuerdo con la encuesta intercensal de 2015, en México hay 12 025 947 indígenas que representan el 21.5% de la población total, de éstos 7 387 341 son individuos mayores de 3 años que hablan alguna lengua indígena, de las cuales 51.11% son mujeres y 48.89% son hombres (INEGI, 2015). La Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas (CDI), identificó 62 grupos etnolingüísticos en México, los que se definen a partir de la principal lengua que hablan

y el territorio donde se ubican. Dentro de éstos, los indígenas huicholes son uno de los grupos más conservados en sus tradiciones y cultura (CDI, 2010). En estas poblaciones la base económica se centra en la agricultura minifundista, con trabajadores involucrados directamente en la producción con una división del trabajo poco especializada (CEDRSSA, 2019). En general la mano de obra agrícola de México se compone de personas provenientes de las regiones más pobres y marginadas del país, dentro de las que se encuentran las poblaciones indígenas. Estos trabajadores son contratados temporalmente para desempeñar actividades de siembra, cosecha, recolección y preparación de productos. Además, muchos de ellos se ven obligados a abandonar sus comunidades de origen en la búsqueda de un mejor ingreso económico para sus familias (SEDESOL, 2010). Sin embargo, en sus sitios de destino estas familias son aún más vulnerables, debido a que viven dentro de los campos agrícolas con una constante exposición a compuestos tóxicos como los plaguicidas, con excesivas jornadas laborales y sin acceso a servicios básicos de salud (Carmen y Waghiyi, 2012).

El 21.5% de la población mexicana corresponde a individuos de algún grupo étnico. En el estado de Nayarit, el 22.18% de la población se considera indígena, lo que representa el 5.4% de la población indígena del país, con mayor prevalencia de los grupos étnicos coras y huicholes que en conjunto representan el 89.4% de la población indígena del estado (Figura 1) (INEGI, 2017). Los huicholes se ubican principalmente en los municipios de Mezquitic y Bolaños en el estado de Jalisco; La Yesca, El Nayar y Tepic en el estado de Nayarit. Su actividad productiva se basa en el cultivo de diversos productos para autoconsumo como calabaza, amaranto, frijol y chile. Parte de la población recurre al trabajo asalariado durante temporadas estacionales en plantaciones agrícolas de tabaco, tomate y otros productos de los municipios costeros del estado de Nayarit. Así mismo, la artesanía y ganadería son actividades económicas importantes para estas comunidades (INPI, 2018).

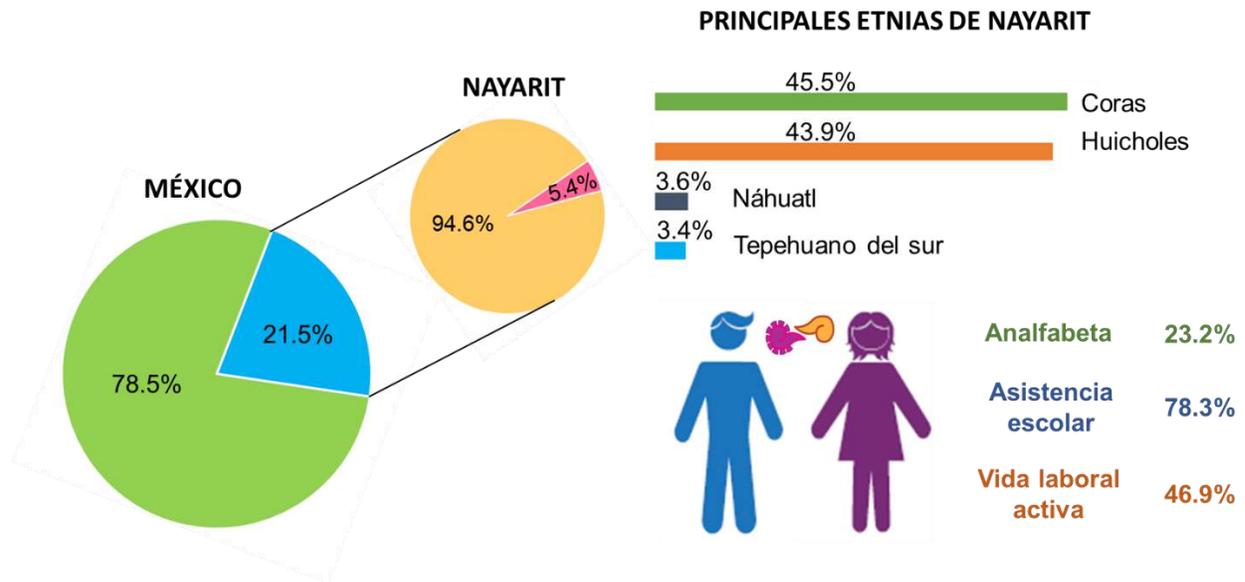


Figura 1. Población indígena del país y del estado de Nayarit (Fuente: INEGI, 2017).

1.2 Vulnerabilidad de las comunidades indígenas huicholas a la exposición a plaguicidas

Cada año, aproximadamente el 40% de las familias huicholas dejan sus comunidades en temporada de secas para buscar empleo en los campos agrícolas (Gamlin, 2013). La migración de los indígenas obedece principalmente a la necesidad de contar con un ingreso que permita la supervivencia, en muchas ocasiones el jefe de la familia migra a los campos acompañado de su familia, lo que implica también la exposición de niños y mujeres a plaguicidas potencialmente tóxicos (Pacheco 1999; Ramos, 2012; Gamlin, 2016). Durante su estancia en el campo, viven en las plantaciones, cocinan sus alimentos al ras del suelo y con frecuencia beben agua proveniente de canales de riego, arroyos y pozos (Ramos, 2012). Aunado a lo anterior, los jornaleros indígenas huicholes, no usan equipo de protección adecuado, no saben leer, ni tienen capacitación sobre el uso y los efectos tóxicos de estos compuestos (Díaz-Romo y Salinas-Álvarez, 2002). De esta manera, los jornaleros indígenas huicholes, constituyen un grupo vulnerable a los efectos adversos asociados con la exposición a plaguicidas.

Sin embargo, a pesar de la alta vulnerabilidad que presentan estas comunidades a estos compuestos, se han realizado pocos estudios acerca de los efectos que ocasionan los plaguicidas en estas poblaciones. Uno de los primeros estudios realizados en grupos indígenas fue el de Diaz-Romo y Salinas-Álvarez (2002), en el que se analizaron los efectos de los plaguicidas a nivel cognitivo en los niños huicholes, así como, las implicaciones socioeconómicas involucradas en la problemática de migración de las familias huicholas. Posteriormente, Gamlin (2013) realizó un estudio en comunidades indígenas huicholas de Santiago Ixcuintla que trabajaban en campos tabacaleros, con el fin de evaluar la influencia de las características socioculturales de estas poblaciones sobre la exposición a plaguicidas. Además, reportó que estas poblaciones son más vulnerables a los efectos adversos de los plaguicidas debido a las condiciones en las cuales viven estas familias en los campos tabacaleros, ya que cocinan, duermen, comen y realizan todas sus actividades sin ninguna medida de protección. Así también, evidenció la dificultad de los huicholes migrantes para leer la información que está escrita en los envases de los plaguicidas. Además, las creencias culturales de estas comunidades han influido en la interpretación de las imágenes en los envases y con ello, en la relación que establecen entre los plaguicidas y la salud. Es así, que diversos síntomas asociados con la exposición a plaguicidas son asociados con creencias propias de la etnia huichol, como castigos que deben cumplir por una falta cometida (Gamlin, 2013).

Por otro lado, Bernal-Hernández et al. (2014) determinaron las posibles alteraciones en parámetros hematológicos, bioquímicos (medición de las actividades acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BuChE), por exposición ocupacional a plaguicidas en jornaleros indígenas huicholes del estado de Nayarit, comparado con una población no expuesta ocupacionalmente. En el estudio se observaron alteraciones en la concentración de linfocitos, leucocitos, hemoglobina, así como, una disminución significativa de la actividad BuChE en el grupo expuesto. Un estudio reciente realizado por López-Martínez et al. (2018) reportó una inhibición de 33% de la actividad AChE y 55% de la actividad BuChE en una población de jornaleros indígenas huicholes expuestos a plaguicidas.

1.3 Uso de plaguicidas en Nayarit

En México se han usado plaguicidas en la agricultura desde fines del siglo XIX. Hasta mediados del siglo pasado, se utilizaban cerca de 40 compuestos naturales de tipo botánico o inorgánico (Albert, 2005). Según datos reportados por la Organización de Agricultura y Alimentación de los Estados Unidos (FAO), para el año 2016, México ocupó el séptimo lugar en América en el uso agrícola de plaguicidas, con un volumen total de 47,219.27 toneladas de ingrediente activo en el país; de los cuales el 61.44% corresponde a fungicidas y bactericidas, 20.38% a herbicidas y 18.18% a insecticidas (FAO, 2016). Asimismo, se ha reportado que en México se utilizan 140 ingredientes activos de plaguicidas prohibidos en otros países y 183 ingredientes activos de plaguicidas clasificados como altamente peligrosos (Bejarano-González, 2017). Los principales estados de la República Mexicana donde se concentra el mayor uso de estos compuestos son: Campeche, Chiapas, Chihuahua, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz (Secretaría de Salud, 2012).

El estado de Nayarit se encuentra en el quinto lugar de los estados con mayor uso de plaguicidas en México (Secretaría de salud, 2012). La principal actividad económica del sector primario es la agricultura, donde los productos que mayormente se cultivan son: sorgo, frijol, mango, caña de azúcar, maíz, entre otros (SIAP, 2017) y que, de acuerdo con las recomendaciones emitidas por SAGARPA, para el control de plagas en estos cultivos, se utilizan principalmente plaguicidas organofosforados (POF) y en menor proporción carbamatos (CB) (Hernández-Antonio y Hansen, 2011).

Un estudio realizado por González-Arias et al. (2010) en el estado de Nayarit, reportó que la zona con mayor uso y consumo de éstos es la zona norte del estado, que abarca los municipios de Acaponeta, Rosamorada, Ruiz, San Blas, Santiago Ixcuintla, Tecuala y Tuxpan. Aunado a lo anterior, de acuerdo con lo reportado por los Servicios de Salud de Nayarit, en el 2017, se registraron 156 casos de intoxicación por plaguicidas, de los cuales el 75% corresponde a población masculina, situándose como el séptimo estado con mayores casos de intoxicación para ese año (Secretaría de salud, 2017).

1.4 Plaguicidas anticolinesterásicos más utilizados en el estado de Nayarit

Los plaguicidas más utilizados en el estado de Nayarit son los POF (50%), seguido por piretroides (20%), CB (8%) y organoclorados (8%), entre otros (14%) (González-Arias et al., 2010). Esta tendencia ha sido observada en estudios posteriores realizados en poblaciones ocupacionalmente expuestas del estado (Rojas-García et al., 2011; Bernal-Hernández et al., 2014; Zepeda-Arce et al., 2017; Herrera-Moreno et al., 2018). Particularmente, clorpirifos (20.6%), metamidofos (17%), paratión metílico (16.3%) y dimetoato (13%) son los POF que se usan principalmente en las actividades agrícolas (González-Arias et al., 2010). Un segundo estudio realizado en Nayarit mostró que temefos (52.9%), clorpirifos (35.1%), malatión (7.1%), paratión (3.5%) y metamidofos (1.1%) son los POF que usan principalmente en fumigaciones urbanas (Zepeda-Arce et al., 2017).

Los POF son compuestos sintéticos normalmente ésteres, amidas o tioles derivados de ácidos fosfóricos, fosfónicos, fosforotióicos o fosfonotióicos (Samuels y Obare, 2011; Stoytcheva y Zlatev, 2011). La mayoría de los POF se caracterizan por presentar baja solubilidad en agua, alto coeficiente de partición octanol-agua y una baja presión de vapor. La estabilidad de los POF depende del pH del medio, se inactivan a pH básico, se hidrolizan en presencia de luz solar y tienden a disolverse en grasas. Son utilizados como insecticidas en la agricultura, industria y a nivel doméstico (Ragnarsdottir, 2000; Czerwinski et al., 2006). El uso de POF en Nayarit se ha destinado particularmente al sector agrícola y campañas de salud (López-Martínez et al., 2018; CENAPRECE, 2018). Estos compuestos pueden ser absorbidos por vía dérmica, respiratoria u oral. Una vez que se absorben, los POF se distribuyen rápidamente a órganos y tejidos, y son biotransformados a nivel hepático a través de diferentes reacciones de hidrólisis, oxidación y conjugación (Balali-Mood y Balali-Mood, 2008; Sudakin y Stone, 2011). Los POF pueden ser clasificados como inhibidores directos e indirectos de la AChE, los inhibidores directos son efectivos sin ninguna modificación metabólica adicional después de la absorción. Los plaguicidas fosforotióicos como clorpirifos, principalmente fósforotioatos y fósforoditioatos, se caracterizan por presentar el enlace P=S y no son inhibidores directos de la AChE. Sin

embargo, a través de su bioactivación por el citocromo P540 (CYP450) se generan los oxones (P=O) responsables del efecto neurotóxico de estos compuestos (Figura 2) (Balali-Mood y Balali-Mood, 2008; Foxenberg et al., 2011; Sudakin y Stone, 2011).

Después de una exposición aguda a altas concentraciones de POF, se desencadena una serie de efectos como consecuencia de la inhibición competitiva e irreversible de la AChE en las terminaciones nerviosas. Este efecto sobre la AChE es el mecanismo principal de acción de los POF, la deficiencia de electrones del átomo de fósforo favorece la atracción hacia el sitio esteárico de la enzima formando un enlace covalente con el hidrógeno del aminoácido serina presente en el sitio activo de la AChE, la cual queda inhibida sin poder hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina (ACh) en la hendidura sináptica (Costa y Pellacani, 2014; King y Aaron, 2015). La sobreestimulación de los receptores colinérgicos desencadena una serie de efectos tales como sudoración, contracción de las pupilas, lagrimeo, calambres, vómito, visión borrosa, ansiedad, convulsiones, entre otros (Kapka-Skrzypczak et al., 2011; King y Aaron, 2015; Damalas y Koutroubas, 2016).

Respecto a los efectos crónicos de los POF, se han reportado efectos hematológicos (Rojas-García et al., 2011; Bernal-Hernández et al., 2014; Aroonvilairat et al., 2015; García-García et al., 2016; Cattelan et al., 2018; Neghab et al., 2018), actividad estrogénica (Chen et al., 2002; Kang et al., 2004; Kitamura et al., 2006) y androgénica en animales (Kang et al., 2004; Kim et al., 2005; Orton et al., 2011; Mitra y Maitra, 2018), presencia de criptorquidia (Fratrić et al., 2017), alteraciones hormonales (Recio et al., 2005; Blanco-Muñoz et al., 2010; Mnif et al., 2011; Bernieri et al., 2019), efectos inmunológicos y malformaciones congénitas (Galloway y Handy, 2003; Ghorab y Khalil, 2015; Ueker et al., 2016; Kalliora et al., 2018).

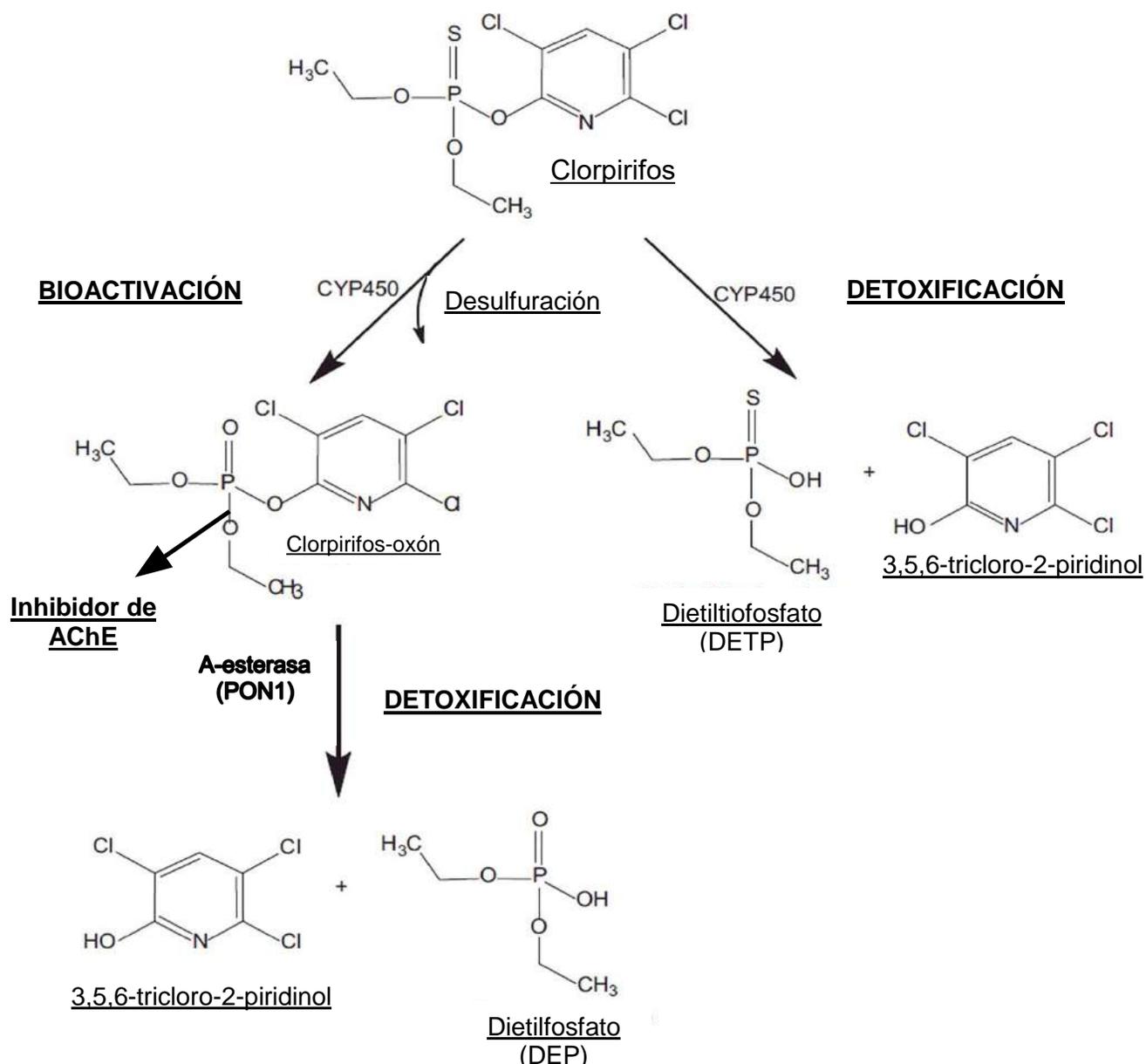


Figura 2. Biotransformación de clorpirifos (Adaptado de Sudakin y Stone, 2011).

Además, se ha demostrado la capacidad mutagénica de estos compuestos y su asociación con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, entre ellos cáncer de mama, próstata, linfomas, mieloma múltiple, sarcomas, enfermedad de Hodgkin y leucemias (Alavanja et al., 2004; Coronado et al., 2004; Blair y Freeman, 2009; Bolognesi et al., 2011; Lerro et al., 2015; Rodríguez et al., 2017; Martin et al., 2018; Sabarwal et al., 2018; Saad-Hussein et al., 2019). En este sentido, se ha sugerido que la relación entre la exposición a plaguicidas con el desarrollo de cáncer puede ser a través de daño

genético y modificaciones epigenéticas (Bolognesi et al., 2011; Collotta et al., 2013; Alexander et al., 2017; Benitez-Trinidad et al., 2017; Ghosh et al., 2018; Sabarwal et al., 2018; Samtani et al., 2018; van der Plaats et al., 2018; Ventura et al., 2019). Además, recientemente se ha evidenciado los posibles efectos transgeneracionales provocados por exposición a plaguicidas en sistemas *in vivo* (Tran et al., 2018). La mayoría de estos estudios muestran efectos dosis dependiente, así como, una relación directa con el tiempo e intensidad de la exposición (Damalas y Koutroubas, 2016).

1.5 Biomarcadores toxicológicos de plaguicidas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a un biomarcador como cualquier medición que refleja una interacción entre un sistema biológico y un agente medioambiental químico, físico o biológico. Los biomarcadores se clasifican en biomarcador de exposición, efecto y susceptibilidad genética (OMS, 1993).

Los biomarcadores de exposición involucran la medición de la concentración de sustancias exógenas, sus metabolitos o productos de la interacción de éstos con las moléculas o células blanco del organismo (Mussali-Galante et al., 2013). La cuantificación de dialquifosfatos (DAP) en orina, son los principales biomarcadores determinados para evaluar la exposición a POF (Kapka-Skrzypczak et al., 2011; Sudakin y Stone, 2011). Los biomarcadores de efecto miden alteraciones en el organismo que pueden ser de tipo molecular, bioquímico, fisiológico, de comportamiento u otro tipo de alteración en el organismo que, dependiendo de la magnitud, se puede asociar con un deterioro en la salud o el desarrollo de enfermedades (Araoud, 2011; Fan, 2014). Dentro de los biomarcadores de efecto a POF y CB se ha propuesto la medición de la actividad AChE y BuChE (Kapka-Skrzypczak et al., 2011; Lutovac et al., 2017; Cotton et al., 2018). Respecto a los biomarcadores de susceptibilidad, éstos indican una habilidad inherente o adquirida de un organismo en respuesta a una exposición específica (Lionetto et al., 2013). Dentro de los biomarcadores de susceptibilidad se encuentra la evaluación de polimorfismos de enzimas involucradas en la biotransformación de los POF, por

ejemplo, polimorfismos en los genes de *BuChE* y *paraoxonasa 1 (PON1)* (Zhang et al., 2014; Zayed et al., 2015; Sato et al., 2016; Glass et al., 2018).

1.5.1 Actividad de colinesterasas como biomarcadores de efecto y exposición a plaguicidas anticolinesterásicos

Las colinesterasas son enzimas que pertenecen al grupo de serinas hidrolasas con alta afinidad por los ésteres de colina, pero diferentes de las serinas proteasas (Assis et al., 2018). Además de la inhibición por agentes anticolinesterásicos, la actividad de éstas puede ser modulada por diversos factores, tales como edad, sexo, estado fisiológico, entre otros (Nigg y Knaak, 2000; Clark, 2002). No obstante, la medición de estas actividades sigue siendo parte de los biomarcadores clásicos para evaluar la exposición a compuestos anticolinesterásicos (Maroni et al., 2000; Quandt et al., 2010; Bernal-Hernández et al., 2014; Assis et al., 2018). Se ha documentado que la actividad BuChE funciona mejor que la actividad AChE para identificar exposición a compuestos anticolinesterásicos a corto plazo; mientras que el efecto inhibitorio de la AChE prolongado ha permitido catalogarlo como un biomarcador efectivo en exposiciones de mayor duración (Kamel y Hoppin, 2004; Lionetto et al., 2013; Assis et al., 2018).

1.5.1.1 Acetilcolinesterasa

La AChE se encuentra principalmente en las uniones neuromusculares y sinapsis colinérgicas en el sistema nervioso central (Blotnick-Rubin y Anglister, 2018). La AChE modula los impulsos nerviosos responsables de la comunicación neural a través de la hidrólisis de la ACh después de la activación de los receptores en la membrana post-sináptica (Lionetto et al., 2013; Assis et al., 2017). La AChE también se encuentra en la membrana de glóbulos rojos, sin embargo, su función eritrocitaria es desconocida (Daniels, 2007; Lionetto et al., 2013). Esta enzima se compone de dos dominios proteicos distintos: un dominio catalítico de aproximadamente 500 residuos y un péptido C-terminal de menos de 50 residuos. Además, presenta dos subsitios catalíticos: el sitio aniónico y el sitio esteárico (Lionetto et al., 2013). El subsitio aniónico es el sitio de unión con la amina cuaternaria positiva de la acetilcolina, mientras en el

subsitio esteárico es donde se hidroliza la acetilcolina a acetato y colina y está conformado de una triada catalítica formada por tres residuos de aminoácidos serina, histidina y glutamato. La serina realiza un ataque nucleofílico al residuo de histidina que es desprotonado. A continuación, el enlace éster se rompe y el residuo de serina se acetila, liberándose la colina. Por último, el acetato es liberado de la enzima y la serina recobra un protón, recuperándose la actividad enzimática (Tōugu, 2001; Johnson y Moore, 2006; Thapa et al., 2017).

Los POF y CB como se mencionó anteriormente, son inhibidores de la actividad de AChE y tienen una afinidad variable por el sitio esteárico e inactivación de la enzima, ya sea por fosforilación o descarbamilación. Los POF se consideran inhibidores funcionalmente irreversibles de la AChE, ya que el tiempo necesario para liberar la enzima de la inhibición es mayor al tiempo de reactivación de ésta (Lionetto et al., 2011; Assis et al., 2012; Čolović et al., 2013). A menudo, el complejo sufre un proceso de envejecimiento y se vuelve una unión irreversible debido a la pérdida del radical alquilo del átomo de fósforo (Figura 3). En los eritrocitos humanos la reactivación espontánea de la enzima fosforilada se encuentra alrededor de los 42 minutos para los dimetilos y 31 horas para dietilos; mientras el proceso de envejecimiento está entre 3 horas y 42 minutos para dimetilos y de 33 horas para dietilos (Worek et al., 1999; Eddleston et al., 2002; Paudyal, 2008; Assis et al., 2011; King y Aaron, 2015). Por otro lado, la unión de la AChE con los CB es inestable y la regeneración de la enzima carbamilada es relativamente rápida en comparación con la inhibición de POF (Barak et al., 2009; Hayat et al., 2014).

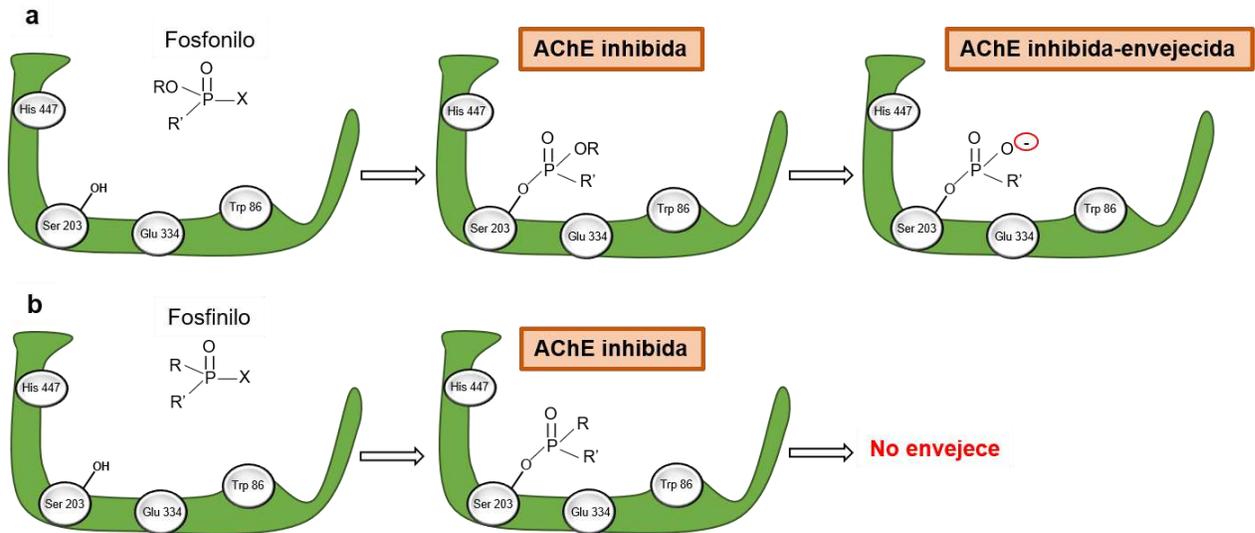


Figura 3. Esquema de la inhibición de la AChE por interacción con POF. Inhibición de POF fosfonilos (a) e inhibición de POF fosfinilos (b) (Fuente: King y Aaron, 2015; Assis et al., 2018).

1.5.1.2 Butirilcolinesterasa

La BuChE se sintetiza en el tejido hepático y es secretada al torrente sanguíneo. Además, se ha encontrado en el músculo liso, páncreas, células adiposas, corazón, piel y cerebro. Se caracteriza por hidrolizar la butirilcolina de manera más eficiente que la acetilcolina. Las funciones de la BuChE no están completamente establecidas, sin embargo, se ha relacionado con procesos de detoxificación (succinilcolina, POF, CB, cocaína, aspirina, benactizina y drofenina) y bioactivación de compuestos exógenos (bambuterol, heroína e irinotecan) (Tõugu, 2001; Çokuğraş, 2003; Assis et al., 2018).

Aunque son diferentes los genes que codifican para AChE y BuChE, estas enzimas presentan una homología en la secuencia de aminoácidos cerca del 65% (Andrisano et al., 2018). En ambas colinesterasas, el centro activo está conformado por la misma triada catalítica, sin embargo, a pesar de su similitud estructural, presentan diferencias en la velocidad de hidrólisis del neurotransmisor ACh. La BuChE es menos eficiente en hidrolizar la ACh comparado con AChE, el centro catalítico de BuChE es más amplio en comparación con la AChE, por lo que puede alojar sustratos más voluminosos, como el sustrato no fisiológico butirilcolina. Además, la actividad catalítica del sitio

activo de BuChE se encuentra influenciado por un sitio adicional de unión denominado sitio aniónico periférico, el cual se encuentra ampliamente caracterizado para la enzima AChE, mientras los estudios para BuChE son aún limitados (Macdonald et al., 2012; Andrisano et al., 2018).

La actividad BuChE es considerada como biomarcador de exposición a POF, ya que reacciona rápidamente con los ésteres organofosforados, incluso en dosis bajas (Lockridge, 2015). Esta enzima tiene una vida media de 12 días en circulación, lo que significa que después de varios días de exposición a POF pueden detectarse en sangre cantidades importantes de la unión POF-BuChE (Lockridge, 2015). La reactivación espontánea de las colinesterasas carbamiladas tiene un tiempo de vida media de 48 horas para AChE (a pH 7 y 25 °C) y alrededor de 2 horas y 17 minutos para BuChE (Reiner, 1971; Assis et al., 2018).

1.5.2 Dialquilfosfatos como biomarcadores de exposición a plaguicidas organofosforados

Los DAP son los metabolitos no específicos más comunes generados durante la biotransformación de diversos POF (Tabla 1). La determinación de éstos provee información acerca de la exposición aguda a POF, por lo que son uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar exposición a POF y han sido determinados en diversas poblaciones expuestas ocupacionalmente a plaguicidas (Rothlein et al., 2006; McCauley et al., 2008; Taneepanichskul et al., 2014; Aguilar-Garduño et al., 2018), incluidos niños (Arcury et al., 2007; Eskenazi et al., 2007; Wilson et al., 2010; Morgan et al., 2011) y mujeres embarazadas (Bradman et al., 2005; Bouchard et al., 2010; Engel et al., 2011; Sokoloff et al., 2016; van den Dries et al., 2018). Los DAP evaluados con mayor frecuencia son: dimetilfosfato (DMP), dimetiltiofosfato (DMTP), dimetilditiofosfato (DMDTP), dietilfosfato (DEP), dietiltiofosfato (DETP) y dietilditiofosfato (DEDTP) (Ueyama et al., 2010; Krieger et al., 2012; Koutroulakis et al., 2014; Cequier et al., 2017). Estos metabolitos se caracterizan por ser compuestos

altamente polares y solubles en agua, con un pK de 1.25 a 1.62 (Margariti y Tsatsakis, 2009; Sudakin y Stone, 2011).

Tabla 1. Ejemplos de POF y sus correspondientes metabolitos dialquilfosfatos

Plaguicida	DMP	DMTP	DMDTP	DEP	DETP	DEDTP
Azinfos metil	X	X	X			
Clorpirifos				X	X	
Clorpirifos metil	X	X				
Diclorvos	X					
Diazinón				X	X	
Dimetoato	X	X	X			
Disulfotón				X	X	X
Malatión	X	X	X			
Metil paratión	X	X				
Paratión				X	X	
Temefos	X	X				
Terbufos				X	X	X
Forato				X	X	

Fuente: Bravo et al., 2004.

1.5.3 Metilación del ADN como biomarcador epigenético

Las modificaciones epigenéticas son cambios heredables en la expresión génica, que ocurren sin alterar la secuencia del ADN. Se han reportado diferentes mecanismos epigenéticos, tales como: metilación del ADN, metilación y acetilación de histonas y los micro ARNs no codificantes (Goldberg et al., 2007; Liu y Lu, 2015; Trerotola et al., 2015).

El mecanismo epigenético más estudiado es la metilación del ADN, que consiste en la adición de un grupo metilo al quinto carbono del anillo de la citosina formando 5-metilcitosina. En mamíferos este proceso ocurre casi siempre en las citosinas ubicadas

en los dinucleótidos CpG que contienen 3-5% de los residuos de citosinas del genoma humano (Jin et al., 2011; Moore et al., 2013; Leenen et al., 2016; Lester et al., 2016). Un cambio en el patrón de metilación de un gen (hipometilación o hipermetilación) puede alterar la expresión o silenciamiento del mismo. Estos cambios en el patrón de metilación se han asociado con el desarrollo de diversas enfermedades como diabetes, desórdenes metabólicos, alteraciones en la nutrición y procesos neoplásicos, entre otros (Costello y Plass, 2001; Tost, 2009; Tost, 2010; Tzika et al., 2018).

De acuerdo con la literatura, ciertos contaminantes ambientales como los plaguicidas, ocasionan modificaciones epigenéticas, éstas pueden alterar la función del genoma y modificar los mecanismos específicos de toxicidad a ciertas sustancias. Además, dichas modificaciones pueden persistir incluso en ausencia de los factores que las generaron (Kanthasamy et al., 2012; Zhang et al., 2012). Recientemente, se ha reportado que exposiciones crónicas a compuestos neurotóxicos pueden causar modificaciones epigenéticas asociadas con alteraciones neurodegenerativas (Hou et al., 2012; Landgrave-Gómez et al., 2015). Algunas de estas alteraciones se han relacionado con la exposición ambiental a plaguicidas, sin embargo, los mecanismos moleculares a través de los cuales éstos ejercen su efecto no han sido completamente dilucidados (Zhang et al., 2012; Collotta et al., 2013; Lester et al., 2016; Kwiatkowska et al., 2017; Rusiecki et al., 2017). Por otro lado, la pérdida de la regulación epigenética se manifiesta con una hipometilación a nivel global del ADN, causando inestabilidad cromosomal, reactivación de elementos transponibles, pérdida de la impronta génica y una hipermetilación en genes específicos principalmente en genes supresores de tumores (Roper y Esteller, 2005; Sadikovic et al., 2008; Watanabe y Maekawa, 2010; Stahl et al., 2016).

1.5.3.1 Metilación gen específica

El locus INK4-ARF codifica para un grupo de genes que representa gran importancia en la regulación del ciclo celular, se encuentra ubicado en el cromosoma 9p21 y es un regulador crítico de la senescencia. En total tres productos génicos están codificados en este locus, dentro de éstos se encuentran las proteínas p16^{INK4a} y p15^{INK4b}

(Simboeck et al., 2011). Ambos genes son inhibidores de las cinasas 4 y 6 dependientes de ciclina (Cdk4/6) provocando el arresto del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S (Krimpenfort et al., 2007). El gen *p15* es inducido por el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el cual inhibe la proliferación del ciclo celular, controla la diferenciación y apoptosis celular, además de ser un regulador negativo de la hematopoyesis (Kusy et al., 2004). El gen *p16* puede ser inducido mediante diferentes rutas, por ejemplo, a través de la vía de las MAP cinasas (cinasas de proteína activadas por mitógenos), así como a través de la proteína p53 (Mirzayans et al., 2012; Xu et al., 2015; Zhu et al., 2017). Estos genes han mostrado diferentes mutaciones en diversos tipos de cáncer, sin embargo, es aún escaso el conocimiento que se tiene acerca de las modificaciones epigenéticas en este locus. Estudios realizados por Zhao et al. (2016) mostraron una hipermetilación en la región promotora del gen *p16* en pacientes con cáncer, por tanto, una disfunción en la regulación del ciclo celular. Adicionalmente, Lu et al. (2014), evidenciaron una hipermetilación en la región promotora de este gen, la cual fue asociada con exposición a arsénico, indicando que el silenciamiento génico de este gen, podría ser un mecanismo importante para el desarrollo de cáncer en poblaciones expuestas a arsénico.

En contraste para el gen *p15*, han sido pocos los estudios en los que se ha evaluado la variación en el porcentaje de metilación del mismo en poblaciones humanas. Xing et al. (2010) determinaron la expresión y metilación de la región promotora de los genes *p15* y *p16* en individuos expuestos a benceno en comparación con una población no expuesta, sin observarse un incremento significativo en la estimación del perfil de metilación de *p16* en los sitios CpG 3 y 4 evaluados. Además, se encontró una correlación negativa entre el nivel de ARN mensajero y la metilación del cuarto sitio CpG analizado de *p16* (Xing et al., 2010).

Con relación a los genes supresores de tumores, el gen *p53*, es conocido como el guardián del genoma y codifica para una proteína involucrada en diversos procesos celulares incluyendo la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, mantenimiento de la estabilidad genómica, regulación transcripcional de algunos genes, segregación

cromosómica, apoptosis, senescencia, entre otras funciones (Vousden y Prives, 2009; Saldaña-Meyer y Recillas-Targa, 2011; Bieging et al., 2014; Saha et al., 2015; Joerger y Fersht, 2016; Miciak y Bunz, 2016; Kasthuber y Lowe, 2017). Diversos estudios han evidenciado que la expresión de *p53* es controlada a través de diversos mecanismos reguladores, sin embargo, es escasa la información disponible sobre como *p53* es regulado transcripcional y epigenéticamente (Su et al., 2009; Carrà et al., 2016; Levine y Berger, 2017; Kim et al., 2018; Sullivan et al., 2018). No obstante, pocos estudios han evaluado la regulación postranscripcional que ejerce *WRAP53* sobre *p53* (Mahmoudi et al., 2009).

WRAP53 es un gen que está localizado en el cromosoma 17p13, presenta empalme alternativo con un total de 17 transcritos y tres exones de inicio alternativos (1 α , 1 β y 1 γ); adicionalmente, se ha evidenciado que el exón 1 α se superpone directamente con el primer exón de *p53* y transcribe en sentido opuesto (Farnebo, 2009). Los análisis de expresión han revelado una correlación positiva entre el ARN mensajero de *WRAP53 α* y el transcrito *p53*, indicando que únicamente el transcrito que presenta el exón 1 α tiene influencia sobre *p53* (Mahmoudi et al., 2009). Estos resultados han sugerido que se requiere una interacción ARN-ARN de *WRAP53/p53* para mantener los niveles normales de *p53* en la célula; de esta forma, es posible que la hibridación entre estos dos transcritos enmascare secuencias diana que interactúen con el ARN mensajero de *p53* y, por lo tanto, lo proteja de la degradación (Farnebo, 2009). En cuanto a *WRAP53 β* , éste codifica para la proteína WRAP53 la cual consta de 548 aminoácidos y presenta un dominio altamente conservado de repeticiones WD40. Esta proteína facilita la interacción de factores involucrados en el splicing y elongación de telómeros y ensamblaje de los orgánulos nucleares conocidos como cuerpos de cajal, así como, en el ensamblaje del citoesqueleto, el tráfico vesicular, el daño y reparación del ADN, muerte celular y progresión del ciclo celular (Silwal-Pandit et al., 2015; Zhang y Zhang, 2015).

2. JUSTIFICACIÓN

Los plaguicidas son compuestos biológicamente activos que se han asociado con el desarrollo de diversas enfermedades. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales éstos ejercen su efecto no han sido completamente dilucidados. Algunos estudios, han propuesto que la exposición a plaguicidas pudiera ocasionar modificaciones epigenéticas en genes específicos, las cuales pueden alterar su función y modificar mecanismos específicos de toxicidad a ciertos compuestos. Dado que los cambios epigenéticos pueden ser transmitidos entre generaciones, evaluar estas modificaciones en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas, como los indígenas huicholes, contribuirá a un mejor entendimiento sobre los efectos de los plaguicidas en estas poblaciones. **En este estudio se evaluaron biomarcadores de exposición, efecto y metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53* en jornaleros indígenas huicholes expuestos a plaguicidas.** Este estudio permitirá conocer la exposición y efectos de los plaguicidas en estas poblaciones, así como, su implicación en la metilación de genes específicos. Asimismo, contribuirá en el desarrollo de futuras investigaciones relacionadas con efectos de la exposición a plaguicidas en poblaciones indígenas.

3. HIPÓTESIS

Los jornaleros indígenas huicholes presentarán alteración en biomarcadores de exposición y efecto, así como, cambios en el patrón de metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53* como consecuencia de la exposición a plaguicidas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar biomarcadores de exposición, efecto y metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53* en jornaleros indígenas huicholes expuestos a plaguicidas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Conocer el estado general de salud de la población de estudio, a través de análisis clínicos de laboratorio (biometría hemática, química sanguínea y examen general de orina).
- 2) Evaluar el uso de equipo de protección personal, perfil de plaguicidas que utilizan, frecuencia de la exposición y presencia de sintomatología asociada con la exposición a plaguicidas, a través de un cuestionario estructurado en jornaleros indígenas huicholes.
- 3) Determinar la actividad BuChE y AChE en jornaleros indígenas huicholes como biomarcadores de exposición y efecto a POF.
- 5) Determinar la concentración de alquilfosfatos (DMP, DMTP, DMDTP, DEP, DETP y DEDTP) en muestras de orina como biomarcador de exposición a POF.
- 6) Estimar el porcentaje de metilación de genes involucrados en el ciclo celular *p15*, *p16* y *WRAP53*.
- 7) Evaluar la posible asociación entre las variables obtenidas a través del cuestionario y los biomarcadores bioquímicos y epigenéticos, en jornaleros indígenas expuestos a plaguicidas.
- 8) Realizar talleres para fomentar el uso de medidas de protección y el manejo de plaguicidas con énfasis en la prevención, atención y reducción de riesgos que afectan la salud en los jornaleros indígenas huicholes.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y analítico en jornaleros indígenas huicholes de tres comunidades: Colorado de la Mora, Zapote de Picachos y Roseta, pertenecientes al municipio de Tepic. Las visitas a estas comunidades se realizaron con el acompañamiento de la CDI. La primera visita fue a inicios de diciembre del año 2016, se invitó a los integrantes de las comunidades a participar en el estudio y se explicaron los objetivos del proyecto, así como, los beneficios a los individuos que desearon participar. Posteriormente, se les aplicó un cuestionario de tamizaje para realizar una valoración de la población de manera temprana. Se realizaron dos muestreos uno de alta exposición (diciembre 2016), cuando los jornaleros trabajan en el campo y el segundo correspondió al periodo de baja exposición (abril 2017) cuando regresan a sus comunidades de origen, en la cual los participantes realizan actividades de pesca, artesanía y siembra de cultivos para autoconsumo. Los individuos que aceptaron participar, firmaron una carta de consentimiento informado y a través de un cuestionario estructurado se determinaron características generales, socioeconómicas, edad, dieta, hábitos nocivos (consumo de drogas, tabaco y alcohol), así como, la exposición a plaguicidas, síntomas relacionados con la exposición y uso adecuado de equipo de protección personal.

En cada muestreo se recolectó una muestra de orina y una de sangre para las diferentes determinaciones analíticas. Estas muestras fueron tomadas tanto en los individuos que decidieron participar en un solo muestreo, así como para aquellos que participaron en los dos periodos de muestreo, en quienes se evaluó el estado general de salud a través de análisis clínicos. El protocolo de investigación fue evaluado y aprobado por la Comisión de Bioética Estatal de Nayarit (CEBN/01/2016).

Para considerar a los trabajadores como indígenas, se tomaron en cuenta los criterios establecidos por el Instituto Nacional Indigenista: formar parte de un hogar indígena, donde el jefe del hogar, su cónyuge o alguno de sus ascendientes declara ser hablante

de lengua indígena; además se incluyeron a individuos que hablarán el dialecto indígena huichol (SEGOB, 2014). Así mismo, se identificó a la población indígena a través del análisis de fenotipo del grupo sanguíneo (ABO, Rh). En total se obtuvo una participaron de 210 individuos, sin embargo, después de determinar el grupo sanguíneo de los participantes con base en los criterios de inclusión, se realizó una selección final de 191 indígenas huicholes que conformaron la población de estudio de los cuales 115 individuos pertenecían a la comunidad de Colorado de la Mora, 21 a Roseta y 55 a Zapote de Picachos.

Criterios de inclusión y exclusión: Se incluyeron en el estudio a jornaleros indígenas, hombres y mujeres que aceptaron participar voluntariamente en el estudio, y que presentaron el grupo sanguíneo O Rh positivo. Como criterios de exclusión, se consideró a los individuos que no contaron con su carta de consentimiento debidamente firmada.

5.2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

5.2.1 Recolección y procesamiento de muestras

A los participantes del estudio, se les pidió una muestra de orina y una de sangre venosa, la cual se extrajo por venopunción durante los periodos que decidieron participar dependiendo de cada caso. Posteriormente, se realizaron alícuotas, en tubos sin anticoagulante y con anticoagulante EDTA para las diferentes determinaciones analíticas, se centrifugaron y almacenaron a -20 °C para su posterior análisis. La muestra de sangre del tubo sin anticoagulante se utilizó para la determinación de la bioquímica clínica y actividad BuChE, mientras la obtenida con EDTA se utilizó para la medición de la actividad AChE y la determinación del porcentaje de metilación gen específica, biometría hemática, sistema de grupos ABO y Rh.

El sistema de grupos ABO y Rh, biometría hemática y en la bioquímica sanguínea (glucosa, urea, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina, ácido úrico, colesterol y triglicéridos) se analizaron en un laboratorio clínico certificado.

5.2.2 Determinación de la actividad acetilcolinesterasa en sangre total

Reactivos

- Buffer fosfato (0.1 M, pH 7.4)
- 5,5-Ditiobis-2-ácido dinitrobenzoico (DTNB)
- Yoduro de acetiltiocolina (28.3 mM)
- Etopropazina (6 mM)
- Tritón X-100 (0.03%)

Fundamento

El principio de este método fotométrico se basa en la hidrólisis del sustrato yoduro de acetiltiocolina por la enzima AChE. La tiocolina liberada reacciona con el cromóforo DTNB produciendo el anión ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, compuesto de color amarillo con una absorbancia entre 405 a 420 nm de longitud de onda, con un óptimo de 412 nm.

Procedimiento

Se realizó una dilución 1:100 de la muestra de sangre completa con una solución de tritón X-100 (0.03%) y se agitó en vortex hasta lograr la hemólisis completa de la muestra. A continuación, se mezcló 1 mL del hemolizado con 2 mL de buffer de fosfatos (0.1 M; pH 7.4), 0.1 mL de DTNB (10 mM) y 0.01 mL de etopropazina (6 mM). Posteriormente, la mezcla se incubó a 37 °C durante 10 minutos y se agregaron 0.05 mL del sustrato yoduro de acetiltiocolina (28.3 mM). El cambio de absorbancia a 436 nm fue monitoreado durante 3 minutos, desde el tiempo cero, realizando mediciones cada minuto. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA). La actividad AChE fue corregida por la concentración de hemoglobina y se expresó en U/g de hemoglobina. Hasta el momento, no existen valores de referencia de la actividad AChE en poblaciones indígenas. Con base en el estudio piloto realizado por Bernal-Hernández (2013), en una población indígena huichol no expuesta ocupacionalmente a plaguicidas se estableció el siguiente rango de referencia: 19-32 U/g de Hb para este estudio.

La actividad AChE se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\text{abs} = \left(\frac{(\text{abs } 1 - \text{abs} 0) + (\text{abs} 2 - \text{abs} 1) + (\text{abs} 3 - \text{abs} 2)}{3} \right)$$

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

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

5.2.3 Determinación de la actividad butirilcolinesterasa en suero

Reactivos

- Buffer fosfato (0.1 M, pH 7.4)
- 5,5-ditiobis-2-ácido dinitrobenzoico (DTNB)
- Yoduro de S-butiriltiocolina (63.2 mM)

Fundamento

La BuChE hidroliza al sustrato S-butiriltiocolina, liberando tiocolina que a su vez reacciona con el cromóforo DTNB, dando como producto al anión ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, el cual es acompañado del incremento de una coloración amarilla en la muestra. La detección de la absorbancia del producto se encuentra en un rango 405 a 420 nm, con un óptimo a 405 nm. La actividad BuChE fue reportada en U/L.

Procedimiento

Se preparó una mezcla de reacción con 10 μL de suero, 3 mL de buffer fosfato (0.1 M a pH 7.4) y 100 μL de DTNB (10 mM), se incubó a 37 °C por 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 50 μL de yoduro de S-butiriltiocolina (63.2 mM) y se monitoreó el cambio de absorbancia a 405 nm cada minuto, durante 4 minutos en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10Bio (Wisconsin, USA). No existen valores de

referencia de la actividad BuChE en poblaciones indígenas, Con base en el estudio piloto realizado por Bernal-Hernández (2013), en una población indígena huichol no expuesta ocupacionalmente a plaguicidas se estableció el siguiente rango de referencia: 3027-5083 U/L para este estudio.

La actividad BuChE se calculó mediante las siguientes ecuaciones:

$$\Delta\text{abs} = \left(\frac{(\text{abs } 1 - \text{abs} 0) + (\text{abs} 2 - \text{abs} 1) + (\text{abs} 3 - \text{abs} 2) + (\text{abs} 4 - \text{abs} 3)}{4} \right)$$

$$\text{BuChE U/L} = \left(\frac{\text{Vol. Total}}{(\text{E})(\text{cm})(\text{Vol. de suero})} \right) \left(\frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1 \mu\text{mol}} \right) \left(\frac{1\text{L}}{1000 \text{ mL}} \right) \left(\frac{\Delta\text{abs}}{\text{min}} \right)$$

5.2.4 Determinación de alquilfosfatos en muestras de orina

Reactivos

- Estándar interno dietiltiofosfato deuterado (DETP-d10, 12.5 ppb)
- Acetonitrilo grado HPLC
- Carbonato de potasio grado reactivo
- Bromuro de pentafluorobenzilo (PFBBr)
- Mezcla hexano/diclorometano (Hex/DCM) (92%/8%)
- Agua desionizada

Procedimiento

Los alquilfosfatos fueron determinados en muestras de orina de acuerdo con el método descrito por Valcke et al. (2006), con modificaciones realizadas por Ramírez-Jiménez et al. (2014). El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se realizó la fortificación de las muestras con 20 μL del estándar interno y se dejó reposar a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente, se dejó que las muestras alcancen la temperatura ambiente y se adicionó 1 mL de acetonitrilo, 200 mg de carbonato de potasio y 10 μL del agente derivatizante PFBBr y se incubó la mezcla en baño maría a 80 °C por 2

horas e inmediatamente se realizó un choque térmico con agua a 4 °C por 1 minuto. A continuación, en la fase de extracción se adicionó 2 mL de agua desionizada, 7 mL de la mezcla Hex/DCM y se centrifugó a 2800 rpm durante 10 minutos. Se observó la separación de dos fases y se transfirió la fase orgánica a un tubo nuevo que se llevó a evaporación bajo corriente de nitrógeno a 30 °C hasta alcanzar un volumen final de 500 µL. Inmediatamente después, se repitió el proceso de extracción hasta alcanzar un volumen final de 100 µL. Por último, se transfirieron 100 µL a un vial ámbar con inserto y se adicionó 100 µL de hexano para llevar a micro-evaporación bajo corriente de nitrógeno a 30 °C hasta alcanzar un volumen de 100 µL (este procedimiento se repitió 3 veces). Finalmente, se sellaron los viales y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. La cuantificación se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas a través del monitorio de ion selectivo. Las concentraciones de alquilfosfatos fueron corregidas por gravedad específica siguiendo el método de Sokoloff et al. (2016) y se expresaron en ng/mL. En la Figura 4 se muestra a detalle el procedimiento realizado.

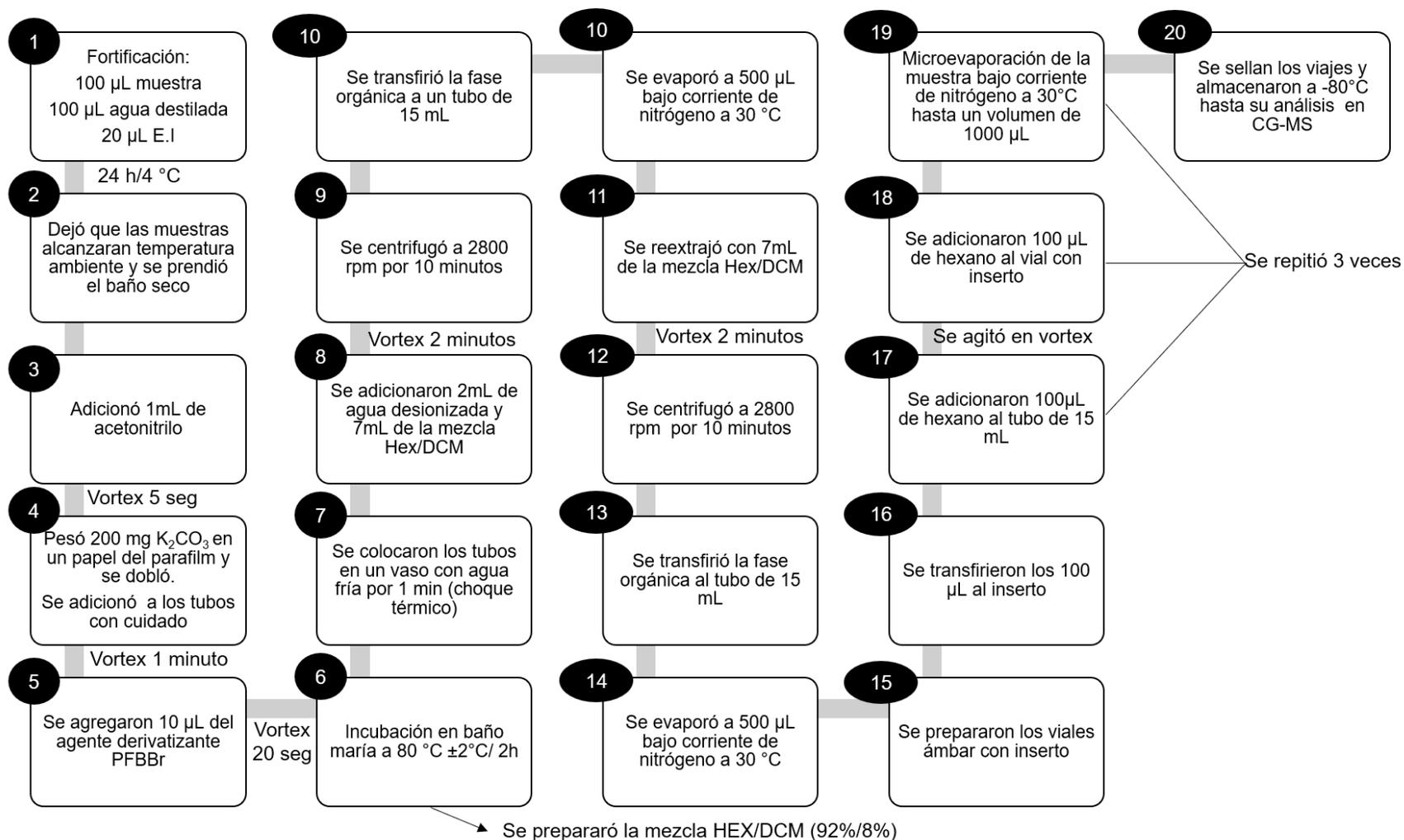


Figura 4. Procedimiento realizado para la extracción de alquilfosfatos. E.I: estándar interno; PFBBr: bromuro de pentafluorobencilo; DCM: diclorometano; Hex: hexano.

5.2.5 Estimación del porcentaje de metilación de genes involucrados en ciclo celular *p15*, *p16* y *WRAP53*

5.2.5.1 Extracción de ADN

Reactivos

Kit PureLink Genomic DNA de invitrogen

Agua inyectable

Procedimiento

La extracción de ADN se realizó a partir de sangre total y se siguió el procedimiento establecido por el fabricante: a 200 µL de sangre se adicionó 20 µL de proteinasa K y 20 µL de RNAsa A, se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de buffer de lisis/unión, se mezcló en vortex por 5 segundos y se incubó a 55 °C en un termoblock por 10 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionaron 200 µL de etanol grado biología molecular, se mezcló en vortex por 5 segundos y transfirió el lisado en una columna que se llevó a centrifugación a 10,000 RCF durante 1 minuto a temperatura ambiente y se descartó y reemplazó el tubo colector. Posteriormente, en la fase de lavado se adicionó 500 µL de buffer de lavado 1, se centrifugó a 10,000 RCF durante un minuto a temperatura ambiente, se descartó el líquido del tubo colector y se reemplazó el tubo colector. Inmediatamente, se adicionó 500 µL del buffer de lavado 2, centrifugó a velocidad máxima (13,000 RCF) por 3 minutos a temperatura ambiente y se descartó el tubo colector. Finalmente, la elución se llevó a cabo utilizando agua inyectable y se centrifugó a 10 000 RCF por 1 minuto. En total se obtuvieron tres eluyentes; el primero de 50 µL, el segundo y tercero de 20 µL. Al final del procedimiento se realizaron las mediciones de concentración y pureza en un Nanodrop 1000c para establecer que el ADN cumplía con los requisitos para el procedimiento de modificación con bisulfito de sodio. Se seleccionaron la muestra que presentaron una concentración mínima de 25 ng/µL y una pureza (260/280) de al menos 1.6.

5.2.5.2 Modificación con bisulfito de sodio

Reactivos

EZ DNA methylation kit- Zymo Research.

Procedimiento

Se prepararon las muestras de ADN a una concentración de 500 ng en un volumen final de 20 µL, se colocaron en la placa de conversión, se agregó reactivo de conversión (125 µL) y se mezcló por pipeteo. Posteriormente, se cubrió la placa con una lámina de aluminio y se centrifugó a 1200 rpm por 1 minuto a 4 °C, la placa se colocó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: 98 °C por 10 minutos, 2 ciclos de 1.25 horas a 64 °C y finalmente se dejó a 4 °C hasta el retiro de la placa. Al mismo tiempo, se preparó la placa de silicón A, que se posicionó sobre la placa de colección y se adicionó 400 µL de buffer de unión. El ADN incubado en el termociclador se adicionó a la placa de silicón A, se mezcló por pipeteo, se cubrió la placa con una lámina de PCR y se centrifugó a 2250 RCF por 10 minutos a 4 °C. Al finalizar, se descartó el residuo de la placa de colección, se adicionó buffer de lavado (400 µL), se selló y se centrifugó a 2250 RCF por 10 minutos. Posteriormente, se adicionó buffer de desulfonación (200 µL) y se cubrió nuevamente e incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una vez finalizada la incubación, se centrifugó a 2250 RCF por 10 minutos, se descartó el residuo de la placa de colección e inmediatamente, se adicionó buffer de lavado (400 µL) y se centrifugó a 2250 RCF por 15 minutos. Al terminar, la placa de silicon A, se posicionó sobre la placa de elución y se adicionó buffer de elución (30 µL), se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y centrifugó a 2250 RCF por 6 minutos. El ADN convertido fue almacenado a -80 °C hasta su análisis.

5.2.5.3 Amplificación por PCR

Reactivos

- Primers
- ADN convertido
- Agua grado PCR
- Nucleótidos
- Green Go Tag

Procedimiento

Se realizó una mezcla de 1 µL de cada uno de los primers forward y reverse (Tabla 2), 15 µL de Green Go Tag y 10 µL de agua milli-Q para cada uno de los pozos de la placa de PCR. A continuación, se adicionaron 3 µL de ADN modificado, se mezcló por pipeteo suavemente y se llevó al termociclador bajo las siguientes condiciones: 95 °C por 3 minutos, 40 ciclos a 95 °C por 45 segundos, 56 °C por 45 segundos y 72 °C por 1 minuto, y un ciclo final a 72 °C por tres minutos. Para corroborar la eficiencia de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% para cada una de las muestras. Los productos de PCR fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis.

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación de ADN

<i>p15</i>	
Primer forward (5'-3')	GGTTGGTTTTTTATTTTGTAGAG
Primer reverse (5'-3')	[Btn]AAAAACCTAAACTCAACTTCATTACC
<i>p16</i>	
Primer forward (5'-3')	GGTGGGGTTTTTATAATTAGGAAAG
Primer reverse (5'-3')	[Btn]AAACTAAACTCCTCCCCACCTAC
<i>WRAP53</i>	
Primer forward (5'-3')	TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA
Primer reverse (5'-3')	Biotin-AAAATCAAAAATTCCCTTTC

5.2.5.4 Pirosecuenciación

Reactivos

- Kit Pyromark Q24
- Primers

Procedimiento

Se preparó la mezcla 1 que consistió en 40 μL de buffer de unión, 1 μL de perlas de sefarosa-estreptavidina y 19 μL de agua grado molecular. A cada pocillo se adicionó un volumen de 60 μL de la mezcla 1, excepto en el pocillo C8 correspondiente al control oligo, en el cual se adicionó 40 μL de mezcla 1. A continuación, se agregó 20 μL del producto de PCR, excepto en el pocillo C8, donde se adicionó 40 μL de control oligo; se selló la placa con una lámina de PCR y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos con agitación constante a 1400 rpm. Al mismo tiempo de la incubación se preparó la mezcla 2 que consistió en 630.5 μL de buffer de alineamiento y 19.5 μL del primer de secuenciación (0.3 μM). En la Tabla 3 se muestran las secuencias de los primers utilizados para cada uno de los genes. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 25 μL de la mezcla 2 en cada pozo, excepto en el pocillo C8, en la cual se agregaron 25 μL del buffer de alineamiento. Se agitó la mezcla brevemente en vórtex con el fin de resuspender las perlas de sefarosa-estreptavidina e inmediatamente se llevó al pirosecuenciador para la separación de las hebras y liberación de las muestras dentro de la placa del Pyromark Q24. Una vez liberadas las perlas en la placa de secuenciación, se realizó el calentamiento en baño seco a 80 °C por 2 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 10 minutos y posteriormente se mantuvo la placa a 4 °C. Se preparó el cartucho con los dinucleótidos, se introdujo el cartucho y la placa en el pirosecuenciador y se ejecuta el análisis. Los resultados se expresaron como el porcentaje de citosinas metiladas (%5mC). Para el gen *p15* se evaluaron en total 5 sitios CpG ubicados en la región 5'UTR, en el gen *p16* se analizaron 6 sitios CpG ubicados dentro de la región promotora proximal, mientras para el gen *WRAP53* se analizaron 3 sitios CpG de la región codificante ubicados entre el exón 1 α y el intrón 1 α (Figura 5).

Como control de secuenciación, se utilizó el control oligo, el cual es ADN comercial que presenta un 50% de metilación; esta muestra fue introducida en el último pozo de cada una de las placas analizadas. Adicionalmente, el programa cuenta con un control externo que verifica que la modificación del ADN con bisulfito de sodio se haya realizado correctamente. Aquellas muestras que no cumplieron con las pruebas de calidad del método fueron repetidas desde la amplificación del ADN.

Tabla 3. Primers utilizados para el proceso de pirosecuenciación

Gen	Primer
<i>p15</i>	5'GGTTGGTTTTTTATTTTGTAGAG3'
<i>p16</i>	5'TTTTATGATATTAATATTT3'
<i>WRAP53</i>	5'TTTTGAGTTAGGTGTGGGATATA3'

5.2.6 Análisis estadístico

Se generó una base de datos constituida por las variables obtenidas del cuestionario y los datos analíticos. Una vez realizada la captura y limpieza de los datos, y de acuerdo con el comportamiento de los mismos, se procedió a realizar el análisis estadístico. Para el análisis comparativo se aplicaron pruebas de t-student y ANOVA con la prueba post-hoc de Bonferroni para datos paramétricos; mientras para datos no paramétricos se utilizaron las pruebas de U de Mann Whitney y Kruskal-Wallis con la prueba a posteriori de Dunn. Para datos categóricos se utilizó la prueba de χ^2 , o la prueba exacta de Fisher cuando el valor esperado fue menor a cinco en alguna celda. Con el fin de determinar las posibles correlaciones entre variables se utilizaron las pruebas de correlación de Pearson y Spearman para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. Asimismo, se realizaron análisis bivariados y modelaje estadístico mediante asociaciones lineales y logísticas con el fin de evaluar la influencia de los factores evaluados sobre las variables dependientes. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATA versión 11.1 (Stata statistical software, college station, texas).

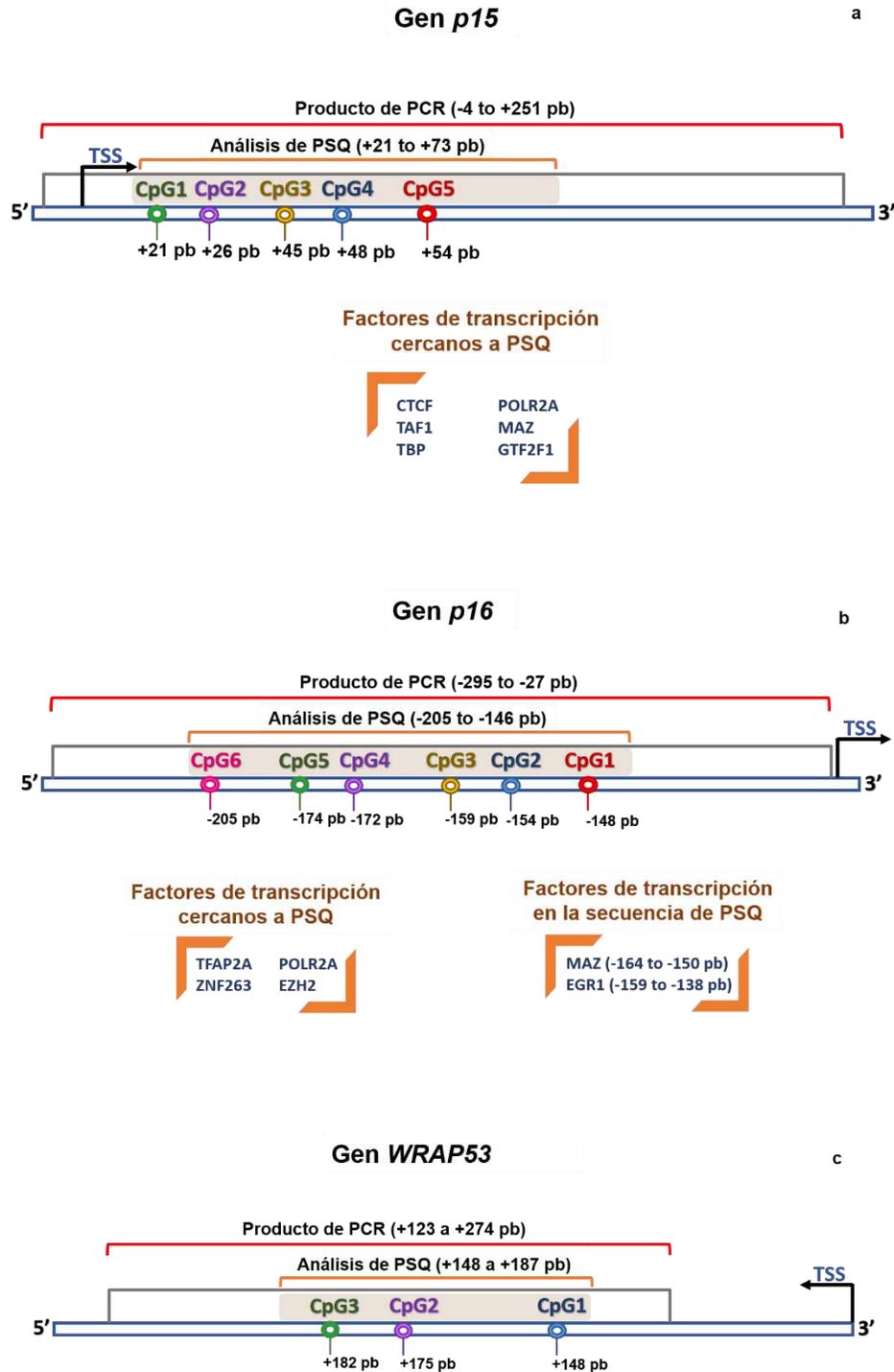


Figura 5. Esquema de los sitios CpG analizados para los genes *p15* (a), *p16* (b) y *WRAP53* (c). TSS: sitio de inicio de la transcripción; PSQ: pirosecuenciación. Los datos fueron obtenidos de ENCODE y de Genome Browser UCSC & NCBI.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Características generales de la población de estudio

Participaron 210 individuos, de los cuales el 58.1% fueron mujeres y 41.9% hombres, con una media de edad de 40 años. El índice de masa corporal (IMC) de la población fue de 26.4 kg/m², el cual es indicativo de sobrepeso de acuerdo con la clasificación de la OMS, además el 63.1% de la población presentó sobrepeso y obesidad. Respecto a los hábitos nocivos, el 56% de la población afirmó consumir bebidas alcohólicas, 32.5% afirmó ser fumador activo y el 70.08% afirmó haber asistido a la escuela, sin embargo, el 37% afirmó no saber leer ni escribir (Tabla 4).

Tabla 4. Características generales de la población de estudio

	Variable	Muestreo total
Sexo, n (%)	Femenino	111 (58.1)
	Masculino	80 (41.9)
Características antropométricas	Edad, MG (IC 95%)	40.1 (37.9-42.4)
	IMC, MG (IC 95%)	26.4 (25.7-27.1)
Educación	Asistencia a la escuela, n (%)	131 (70.8)
	Años de estudio, MG (años)	5.32 (4.6-6.1)
	Analfabetismo, n (%)	68 (37.0)
Hábitos nocivos	Consumo de alcohol, n (%)	107 (56.0)
	Fumador activo, n (%)	62 (32.5)
	Fumador pasivo, n (%)	51 (28.3)
	Años fumando, $\bar{X} \pm DE$	15.9 \pm 13.0
	Consumo de drogas, n (%)	14 (7.8)

MG: Media geométrica; IC 95%: Intervalo de confianza al 95%; \bar{X} : media aritmética; DE: desviación estándar.

Los resultados del IMC son consistentes con lo reportado por Bernal-Hernández et al. (2014), en jornaleros huicholes del estado de Nayarit, quienes reportaron que el 57% de la población presentó sobrepeso y obesidad. El aumento en el IMC ha sido observado en otras poblaciones indígenas del país con frecuencias de sobrepeso y

obesidad entre 50 y 58% (Herrera-Huerta et al., 2012; Guzmán-Saldaña et al., 2017; Ochoa-Díaz-López et al., 2017). El aumento de obesidad en poblaciones indígenas de México y América Latina, se ha relacionado principalmente con el cambio en la alimentación que han sufrido estas poblaciones, que incluye un incremento en la disponibilidad y consumo de alimentos procesados con alto contenido de azúcares y grasas (Asián-Chaves y de los Ángeles Pasos, 2017). Por otro lado, Izquierdo et al. (2016) evaluaron la percepción corporal en 51 mujeres pertenecientes a la comunidad de Chun-Yah en el estado de Quintana Roo, y observaron que más del 50% de las mujeres entrevistadas afirmaron percibir su cuerpo dentro del rango de delgadez, sin embargo, las mujeres menores de 20 años presentaron un promedio de IMC de 28.3 kg/m² en comparación con las mujeres mayores de 20 años que presentaron obesidad (IMC >30 kg/m²), lo que evidencia la diferencia en la concepción del cuerpo en este tipo de poblaciones.

La frecuencia de sobrepeso y obesidad es un fenómeno que ha aumentado en países en vía de desarrollo. Particularmente en México, la obesidad ha sido considerada uno de los principales problemas de salud pública (Barroso, 2012; Asián-Chaves y de los Ángeles Pasos, 2017), ya que un IMC alto es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, principalmente cardiopatías y accidentes cerebrovasculares, diabetes, trastornos del aparato locomotor (en especial osteoartritis) y el posible desarrollo de algunos tipos de cáncer como endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñón y colon (OMS, 2018).

Relacionado al nivel educativo, en este estudio el 70.8% afirmó haber asistido a la escuela; y aunque el 55% asistió a la primaria, sólo el 32.4% cursó los seis años completos, así también se observó que el 37% de los participantes no saben leer ni escribir. Datos similares fueron reportados por Bernal-Hernández et al. (2014), quienes observaron 16.6% de analfabetismo en una población de indígenas huicholes del estado. Diversos estudios han reportado que el nivel educativo es uno de los factores determinantes de vulnerabilidad social (Sandoval-Forero y Montoya-Arce, 2013; Schmelkes, 2013; Terán-Hernández et al., 2016). Dentro de las implicaciones que se

han reportado por el alto grado de analfabetismo en estas poblaciones, se encuentran principalmente la incapacidad para leer las etiquetas de los envases de los plaguicidas que utilizan, lo que los convierte en una población aún más vulnerable a los efectos adversos de éstos (Pacheco, 1999; López-Martínez et al., 2018). Al respecto, el Instituto Nacional para la Evaluación de la Educación (INEE) y el Fondo de las Naciones Unidas para la infancia (UNICEF) reportan que en México 1.4 millones de personas indígenas mayores de 15 años son analfabetas. En el informe se evidencia que los estados con mayor analfabetismo son, Guerrero (30%), Chiapas (25.9%) y Nayarit (23%); concluyendo que uno de los obstáculos más importantes que explican este rezago es el lenguaje, ya que, de acuerdo con las cifras oficiales, hay más de 7 millones de indígenas que únicamente hablan su lengua nativa (Malacara, 2018).

Respecto a los hábitos nocivos, el 56.02% de la población afirmó consumir bebidas alcohólicas, los hombres son quienes presentaron un mayor consumo (70%) respecto a las mujeres (45.95%) y la cerveza fue la bebida que mayormente consumen. Asimismo, únicamente la población masculina (7.78%) reportó el consumo de drogas en el último año y ser fumador activo (21.52%) (Tabla 5). De acuerdo con la CDI, hasta el año 2002 no se contaba con información acerca del nivel de alcoholismo en comunidades indígenas (CDI, 2008). Por lo que aún son escasos los reportes sobre el consumo de alcohol en pueblos originarios, sin embargo, el patrón de consumo de bebidas alcohólicas observado en este estudio, es similar a lo reportado por la CDI en 2008, quienes encontraron una frecuencia de 89% en el consumo de cerveza, particularmente en hombres (68%), y reportó un fuerte consumo de alcohol durante sus rituales y con fines terapéuticos (CDI, 2008). En este mismo sentido, Bernal-Hernández et al. (2014), reportaron una frecuencia de consumo de alcohol de 43.85%. Gómez (2009), reportó que 95% de una población indígena de los Altos de Chiapas, es consumidora activa de alguna bebida alcohólica, con un gasto promedio mensual destinado a la compra de estas bebidas de alrededor del 33% de su ingreso salarial, por lo que el consumo de alcohol es considerado como uno de problemas que más se acrecienta en las poblaciones indígenas del país (Rey et al., 2011; Villalobos, 2013; Pinedo et al., 2014).

Tabla 5. Características generales de la población de estudio por comunidad

Parámetros	Comunidad			p	
	Colorado	Roseta	Zapote		
Sexo, n (%)	Femenino	55 (47.83)	15 (71.43)	41 (74.55)	<0.01 ^a
	Masculino	60 (52.17)	6 (28.57)	14 (25.45)	
Edad (años), MG (IC95%)		39.02 (36.25-42.01)	46.28 (38.06-56.29)	40.05 (36.23-44.29)	0.08 ^b
IMC (Kg/m ²), $\bar{X} \pm DE$		26.00 \pm 4.49	25.62 \pm 4.31	27.56 \pm 4.83	0.10 ^c
IMC n (%)	Bajo peso	3 (2.86)	1 (5.26)	1.92 (1)	0.49 ^a
	Normal	41 (39.05)	6 (31.58)	13 (25)	
	Sobrepeso	43 (40.95)	9 (47.37)	23 (44.23)	
	Obesidad	18 (17.14)	3 (15.79)	15 (28.85)	
Asistió a la escuela, n (%)		83 (74.11)	12 (63.16)	36 (66.67)	0.45 ^a
Nivel de estudio, n (%)	Primaria	44 (53.01)	--	58.33 (21)	0.36 ^a
	Secundaria	15 (18.07)	5 (41.67)	5 (13.89)	
	Preparatoria	21 (25.30)	0	10 (27.78)	
	Universidad	2 (2.41)	0	0	
	Posgrado	1 (1.20)	0	0	
Sabe leer y escribir, n (%)		76 (67.86)	11 (57.89)	29 (54.72)	0.23 ^a
Consumo de alcohol, n (%)		61 (54.95)	12 (63.16)	27 (50)	0.60 ^a
Fuma, n (%)		14 (23.33)	0	3 (23.08)	0.41 ^a

^aÍndice de masa corporal (IMC) de acuerdo con la organización mundial de la salud (OMS): bajo peso (≤ 18.5 kg/m²); peso normal (> 18.5 Kg/m² y ≤ 24.9 Kg/m²); sobrepeso (> 24.9 Kg/m² y ≤ 29.9 Kg/m²), y obesidad (≥ 30 Kg/m²). ^ap fue obtenido por la prueba de Ji²; ^bp fue obtenido por la prueba de U de Mann-Whitney y ^cp fue obtenido por la prueba de t-student. Valores de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. MG: Media geométrica; \bar{X} : Media aritmética; DE: Desviación estándar; IC95%: Intervalo de confianza al 95%.

Por otro lado, el 94.29% de la población de estudio presentó el grupo O Rh+, el 4.76% el grupo A Rh+ y 0.95% el grupo B Rh+ (Tabla 6). Los participantes con grupo sanguíneo diferente al O Rh+, fueron excluidos del estudio. De acuerdo con esta característica, la comunidad de Roseta presentó el mayor grado de mestizaje con una frecuencia de 88.9% del grupo O Rh+, así también, en esta localidad el 8% de los participantes informaron no ser descendientes indígenas y no ser nativos de la comunidad.

Tabla 6. Frecuencia del sistema sanguíneo en la población de estudio

Grupo Sanguíneo	Comunidad		
	Colorado de la Mora n (%)	Roseta n (%)	Zapote de Picachos n (%)
O Rh+	118 (96.7)	22 (88.0)	58 (92.1)
A Rh+	3 (2.5)	2 (8.0)	5 (7.9)
B Rh+	1 (0.82)	1 (4.0)	---
Total de muestras	122	25	63

Los grupos sanguíneos de los sistemas ABO y Rh, además de la importancia que tienen en la práctica médica, han sido ampliamente usados en diferentes investigaciones de interés bioantropológico (Buentello-Malo et al., 2005; Llop et al., 2006; Carnese, 2011). Se ha reportado que el grupo O del sistema de grupos sanguíneos ABO es exclusivo de los nativos americanos, especialmente en América Central y del Sur, donde las frecuencias alcanzan del 96–100%, mientras que A y B son poco comunes (Martínez et al., 1993; Dittmar, 1995; González-Chester y Olsson, 2001; Daniels, 2002; Llop et al., 2006; Georges et al., 2012; Iturbe-Chiñas et al., 2013). Se han formulado varias hipótesis para explicar esta observación, que difieren principalmente en la presunción de que los patrones observados de la diversidad de ABO se deben a procesos demográficos a raíz del contacto europeo (Halverson y Bolnick, 2008; Estrada-Mena et al., 2010; Georges et al., 2012). Por lo que, el sistema ABO es una característica conservada y es considerada como una huella genética en poblaciones indígenas (Chester y Olsson, 2001; Buentello et al., 2008).

En poblaciones no indígenas de México, se han reportado frecuencias entre el 82 y 85% para el grupo O en las zonas centro y sur del país (Lisker, 1981; Lisker et al., 1986; Lisker et al., 1988; Lisker et al., 1990); mientras que en las zonas norte y noreste del país se han reportado frecuencias entre el 79 y 82% para este grupo sanguíneo (Garza-Chapa et al., 1978; Garza-Chapa et al., 1983). Para el estado de Nayarit, se ha reportado una frecuencia de 59.2% para el grupo O, seguido del A (29.62%), B (9.32%) y AB (1.85%) (Canizalez-Román et al., 2018). Al respecto, se han realizado en poblaciones indígenas estudios con el fin de determinar el grado de mestizaje a través de la distribución de los grupos sanguíneos del sistema ABO y Rh en estas comunidades (Rocha-Manilla et al., 2008; Silva-Zolezzi et al., 2009; Canizalez-Román et al., 2018) y se ha reportado un patrón similar respecto a la frecuencia del grupo O Rh+ entre el 97 y 100% en poblaciones genéticamente conservadas del país (Peón-Hidalgo et al., 2002; Buentello-Malo et al., 2008; Iturbe-Chiñas et al., 2013). Dichos estudios sugieren que los procesos demográficos y de adaptación que se han desarrollado a través de la historia, han permitido deducir la arquitectura genética de estas poblaciones, con implicaciones en distintos procesos biológicos en las poblaciones nativas y mestizas (Romero-Hidalgo et al., 2017). Cabe destacar con base en los criterios de inclusión establecidos por el CDI para participar en este estudio, se descartó al 9.05% de los participantes, por lo que sólo se incluyeron en el estudio a 191 individuos.

6.2 Exposición a plaguicidas en la población de estudio

De acuerdo con los resultados, el 84.29% de la población afirmó haber trabajado en el campo en algún momento de su vida, de los cuales, 42.86% se encontraban trabajando activamente en el campo durante el periodo de toma de muestras. Asimismo, se observó que el 53.42% de las mujeres refirieron haber trabajado en el campo, sin embargo, el número de años que llevan en esta labor fue menor al de la población masculina, quienes en promedio han trabajado 14 años en el campo. Adicionalmente, el 90.28% de la población masculina afirmó utilizar plaguicidas y tanto hombres como mujeres se exponen en promedio 6 horas diarias durante 6 días por semana (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia de exposición en la población de estudio por sexo

Variable	Sexo		p
	Masculino	Femenino	
Ha trabajado en el campo, n (%)	66 (48.18)	71 (51.82)	<0.01*
Años trabajando en campo (IC 95%)	14 (10.25-19.12)	4.76 (3.13-7.23)	<0.01+
Días a la semana	6	6	0.10+
Horas al día	6	6	0.18+
Uso de plaguicidas, n (%)	65 (90.28)	25 (35.21)	<0.01*
Ingiere alimentos en el campo, n (%)	23 (35.94)	7 (29.17)	0.55*

*Los valores de p fueron obtenidos por la prueba de χ^2 ; +los valores de p fueron obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Referente a las actividades que realizan en el campo, el 69% de la población masculina afirmó sembrar, cosechar, mezclar y aplicar plaguicidas; en contraste con el 70.7% de las mujeres que afirmaron únicamente sembrar y cosechar; mientras que sólo el 18.7% de las mujeres afirmaron realizar todas las actividades evaluadas en este estudio. Con respecto a los cultivos en los que se emplean, el 76.4% de los jornaleros afirmaron trabajar en parcelas destinadas para el cultivo de maíz, calabaza, sandía, pepino y frijol para autoconsumo (Figura 6). Además, se identificó que estos cultivos se encuentran cercanos a sus viviendas, lo que genera una exposición adicional a la ocupacional, con riesgo no sólo para los jornaleros sino para toda la población. Algunos estudios han evidenciado exposición no ocupacional a plaguicidas en individuos que viven cerca de los campos agrícolas como factor de exposición ambiental (Royster et al., 2002; Ward et al., 2006; Chevrier et al., 2014; Vinceti et al. 2017). En este sentido, Ward et al. (2006) reportaron para una población de Estados Unidos, que los individuos que residían en un radio aproximado de 750 metros respecto a cultivos de maíz y soja presentaron el mismo grado de exposición que los trabajadores agrícolas. Referente al cambio de ropa después de trabajar, los participantes de este estudio afirmaron cambiarse de ropa inmediatamente al llegar a su casa después de laborar en el campo. Sin embargo, el 30% afirmó utilizar la ropa del día anterior sin lavar y 53.3% ha almacenado plaguicidas alguna vez en casa.

Este tipo de hábitos en poblaciones ocupacionalmente expuestas a plaguicidas, es considerado como factor de riesgo adicional de exposición a estos compuestos (Hernández et al., 2007; Al-zain y Mosalami, 2014; Herrera-Moreno et al., 2018).

A través de la encuesta aplicada se identificó que el 57.14% de la población conoce el nombre de los plaguicidas que utiliza. Los plaguicidas reportados principalmente por la población de estudio fueron: los POF (39%), particularmente metamidofos y metil paratión, los cuales están incluidos en el grupo Ia y Ib de acuerdo con su clasificación toxicológica por la OMS. En segundo lugar, los CB dentro de éstos carbofuran y metomilo, seguido de glifosato (16%) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (12%) (Figura 7). Adicionalmente, todos los individuos que brindaron esta información afirmaron utilizar más de un tipo de plaguicida por cultivo.

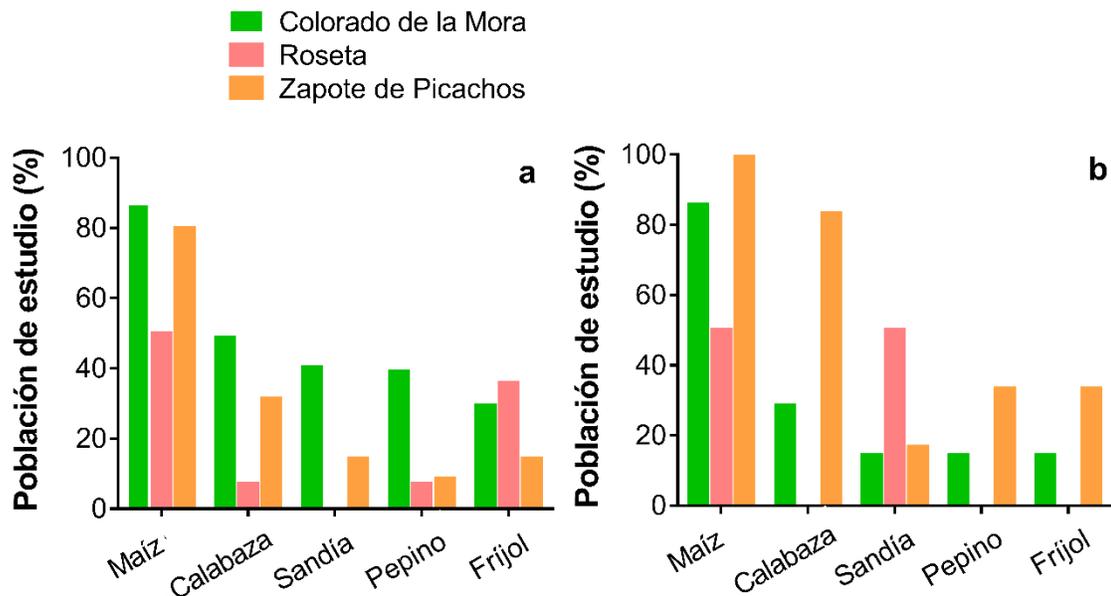


Figura 6. Principales cultivos en los que trabaja la población de estudio. Cultivos de autoconsumo (a) y cultivos de migración (b).

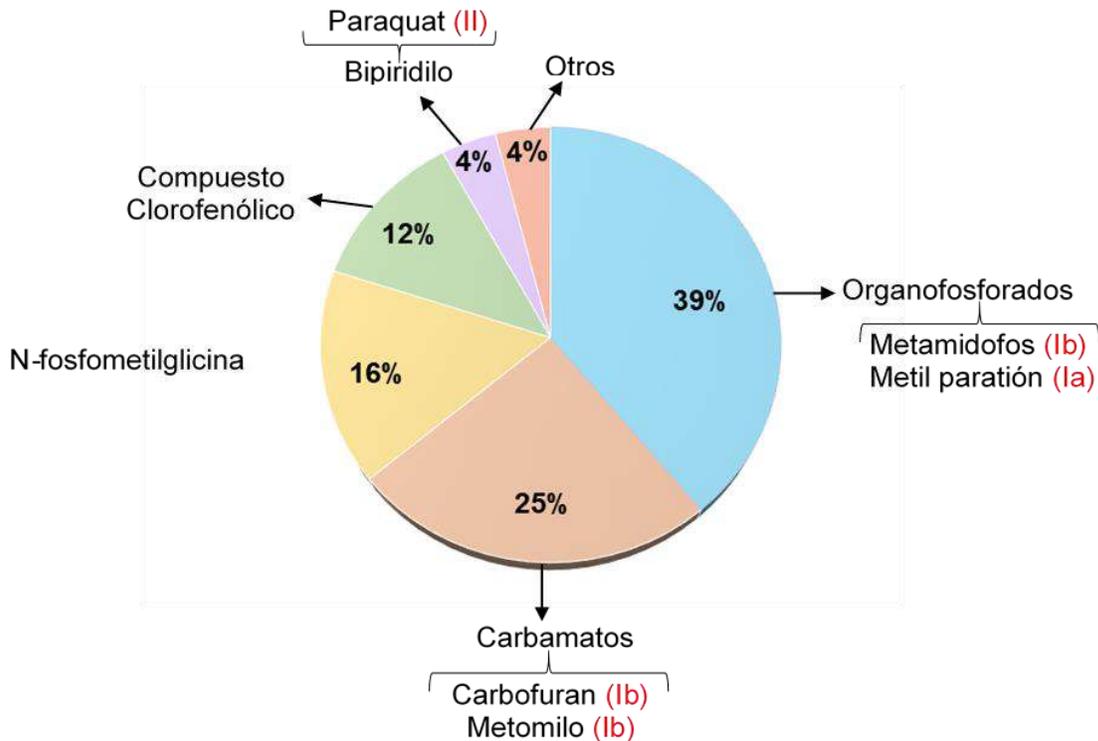


Figura 7. Frecuencia de principales plaguicidas utilizados por la población de estudio. En paréntesis se encuentra la clasificación según la OMS (OMS, 2009).

La información obtenida por la población sobre el uso de plaguicidas es consistente con la reportada por SAGARPA de acuerdo al tipo de cultivo (SAGARPA, 2016), así como, lo reportado en suelos agrícolas (Hernández-Antonio y Hansen, 2011; Leyva-Morales et al., 2014; Silveira-Gramont et al., 2018) (Tabla 8). Asimismo, este patrón en el uso de plaguicidas es similar a lo reportado en otros estudios del estado de Nayarit (González-Arias et al., 2010; Rojas-García et al., 2011; Zepeda-Arce et al., 2017). Específicamente, un estudio en jornaleros indígenas huicholes de Nayarit reportaron que los POF fueron los plaguicidas más utilizados, donde predominaron azinfos metílico, clorpirifos etílico y diazinón (Bernal-Hernández et al., 2014).

Respecto a los síntomas relacionados con exposición a plaguicidas, los participantes refirieron presentar principalmente dolor de cabeza (77.8%), sed constante (72.2%), mareos (72.2%), debilidad (67.9%) y dolor de estómago (61.4%) al momento de estar trabajando en el campo. No se observaron, diferencias significativas entre la sintomatología presentada y el tipo de plaguicida reportado. Estos resultados son

consistentes con los reportados por Bernal-Hernández et al. (2014) en una población expuesta principalmente a POF con síntomas como; dolor de estómago (78%), dolor de cabeza (72%), mareos (67%) e irritación en los ojos (67%). Así mismo, Rojas-García et al. (2011), reportaron que los síntomas más frecuentes en expendedores de plaguicidas del estado de Nayarit fueron: ardor en los ojos (36.1%), sensación de ardor en la piel (30.1%) y opresión en el pecho (19.4%). Diversos estudios en poblaciones ocupacionalmente expuestas han reportado sintomatología similar a lo observado con los jornaleros de este estudio (Strong et al., 2004; Jintana et al., 2009; Rastogi et al., 2010; Bernal-Hernández et al., 2014; Khan y Damalas, 2014; Yaqub et al., 2014; García-García et al., 2016).

Por otra parte, se observó que el 73.3% de la población que trabajaba en el campo, afirmó utilizar algún elemento del equipo de protección personal. Sin embargo, se limitan al uso de sombrero o cachucha y pañuelo (Tabla 9). De acuerdo con lo referido en este estudio, no se cumple con las condiciones establecidas en la norma oficial mexicana NOM-256-SSA1-2012, que refiere las condiciones sanitarias del personal dedicado al control de plagas. Adicionalmente, el 63% de la población de estudio afirmó desconocer que es una intoxicación por plaguicidas; no obstante, el 88.8% de los jornaleros respondió que si considera que su ocupación puede ser peligrosa para su salud y el 96% consideran a los plaguicidas como peligrosos. Sin embargo, esta percepción del riesgo no es concordante con las medidas de seguridad que tiene la población al utilizar estos compuestos. Este patrón sobre la falta de uso de equipo de protección ha sido ampliamente reportado (Jintana et al., 2009; Mahabali y Spanoghe, 2015; Damalas y Koutroubas et al., 2017; Ngammuk et al., 2017; Silvério et al., 2017; Illyassou et al., 2018; López-Gálvez et al., 2018). Las principales causas reportadas son la falta de conocimiento acerca de la toxicidad de los plaguicidas, la falta de insumos por parte del contratista, por ser incómodos y por las condiciones ambientales en las cuales se encuentran los trabajadores (Gamlin, 2013; Andrade-Rivas y Rother, 2015).

Tabla 8. Patrón de plaguicidas utilizados por la población de estudio y su comparación con los recomendados por SAGARPA de acuerdo con los cultivos de la zona

Cultivo	Presente estudio		Estudios en suelo		SAGARPA	
	Ingrediente activo	Grupo químico	Ingrediente activo	Grupo químico	Ingrediente activo	Grupo químico
Maíz	2,4-D	Ác. fenoxiacético	Metamidofos	POF	2,4-D	Ác. fenoxiacético
	Glifosato	N-fosfometilglicina	Metomilo	CB	Metomilo carbofuran	CB
	Diazinón	POF	Diazinón	POF	Carbofuran	CB
Sandía	Metamidofos	POF	Metamidofos	POF	Azinfos metílico diazinón dimeatoato metamidofos	POF
Frijol	Metomilo	POF	Clorpirifos etílico	POF	Acefate azinfos metílico disulfotón	POF
	2,4-D	Ác. fenoxiacético	Imidacloprid	Neonicotinoide	Imidacloprid	Neonicotinoide
Pepino	Furadan	CB	Mancozeb	CB	Mancozeb	CB
	Metamidofos	POF	Diclorvos	POF	Diclorvos	POF
Tabaco	Metamidofos	POF	Metamidofos	POF	Metamidofos	POF
	Azinfos metílico	POF	Azinfos metílico	POF	Azinfos metílico	POF

POF: organofosforados, CB: carbamatos. (Fuentes: Hernández-Antonio y Hansen, 2011; Leyva-Morales et al., 2014; SAGARPA, 2016; Silveira-Gramont et al., 2018)

Tabla 9. Uso del equipo de protección personal en la población de estudio de acuerdo al sexo

Elemento de protección	Mujeres n (%)				Hombres n (%)				<i>p</i>
	Nunca	Pocas veces	Con frecuencia	Siempre	Nunca	Pocas veces	Con frecuencia	Siempre	
Impermeable/ overol	14 (87.50)	1 (6.25)	--	1 (6.25)	41 (85.42)	6 (12.5)	1 (2.08)	--	0.29
Sombrero/ cachucha	4 (25.00)	3 (18.75)	--	9 (56.25)	7 (14.58)	3 (6.25)	1 (2.08)	37 (77.08)	0.28
Mascarilla	15 (100)	--	--	--	40 (83.33)	3 (6.25)	1 (2.08)	4 (8.33)	0.41
Pañuelo en boca y nariz	3 (18.75)	2 (12.50)	1 (6.25)	10 (62.5)	7 (14.29)	5 (10.20)	1 (2.04)	36 (73.47)	0.77
Botas impermeables	11 (73.33)	3 (20.00)	--	1 (6.67)	35 (74.47)	4 (8.51)	2 (4.26)	6 (12.77)	0.51
Lentes de seguridad	12 (80.00)	2 (13.33)	--	1 (6.67)	39 (81.25)	5 (10.42)	2 (4.17)	2 (4.17)	0.83
Guantes	11 (73.33)	1 (6.67)	1 (6.67)	2 (13.33)	35 (72.92)	4 (8.33)	2 (4.17)	7 (14.58)	0.98

Los valores de *p* fueron obtenidos por la prueba de χ^2 .

6.3 Parámetros clínicos en la población de estudio

Con el fin de conocer el estado general de salud de la población, se evaluaron algunos parámetros clínicos en los participantes. Con relación a la fórmula roja, se observó que el contenido eritrocitario y el porcentaje de hematocrito presentaron una mayor alteración en ambos muestreos (Tabla 10). La concentración eritrocitaria se encontró por debajo del nivel de referencia en el 22.6% de las mujeres y 20.3% de los hombres durante el primer muestreo; evidenciándose una menor alteración de este parámetro para el segundo muestreo en ambos sexos (Tabla 10). Respecto a la fórmula blanca, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados entre ambos muestreos.

Hasta el momento, el estudio realizado por Bernal-Hernández et al. (2014), es el único antecedente referente a las alteraciones hematológicas en jornaleros huicholes expuestos a plaguicidas. Los autores reportaron que el promedio del contenido eritrocitario estaba por debajo de los niveles de referencia y observaron una disminución en la concentración de hemoglobina, así como un aumento en el recuento de linfocitos en la población expuesta. Por otro lado, Ahmadi et al. (2018) reportaron variaciones a nivel hematológico en una población de agricultores de Irán con una disminución en el conteo de eritrocitos, concentración de hemoglobina y porcentaje de hematocrito. Además, en un estudio realizado en poblaciones migrantes de Sinaloa se determinó que estas poblaciones presentan seis veces más probabilidad de enfermarse de anemia o asma, dos veces más de contraer parásitos, el doble de infecciones respiratorias y estomacales, así como, 38% más de enfermedades de corazón, debido a la vulnerabilidad que presentan por sus condiciones de vida e ingresos económicos (Palacios-Nava y Moreno-Tetlacuilo, 2004).

Tabla 10. Parámetros hematológicos en la población de estudio por muestreo

Parámetro	Sexo	Rango de referencia	Primer muestreo (n=162)			Segundo muestreo (n=103)			p
			MG IC (95%)	Nivel bajo n (%)	Nivel alto n (%)	MG IC (95%)	Nivel bajo n (%)	Nivel alto n (%)	
Hemoglobina (mg/dL)	M	13-18	14.7 (14.4-15.0)	6 (8.7)	--	14.5 (13.8-15.1)	3 (7.32)	--	0.80
	F	11.6-15.5	12.7 (12.3-13.1)	15 (16.1)	--	12.9 (12.6-13.2)	6 (9.7)	--	0.97
Eritrocitos (mil/mm ³)	M	4.5-6.5	4.8 (4.7-4.9)	14 (20.3)	--	4.6 (4.3-5.0)	11 (26.8)	--	0.16
	F	4.1-5.4	4.3 (4.2-4.4)	21 (22.6)	--	4.4 (4.3-4.5)	5 (8.1)	--	0.45
Hematocrito (%)	--	36-47	41.1 (40.3-42.0)	21 (13.0)	16 (9.9)	40.1 (38.9-41.4)	8 (7.8)	5 (4.9)	0.03
Plaquetas (10 ⁵ /mm ³)	--	1.5-4.0	2.4 (2.3-2.5)	4 (2.5)	7 (4.4)	2.3 (2.2-2.4)	7 (6.8)	2 (1.9)	0.32
Leucocitos (mm ³)	--	4000-10000	7256.8 (6987.4-7536.7)	3 (1.85)	13 (8.02)	7271.9 (6965.2-7592.1)	1 (0.97)	7 (6.8)	0.88
Neutrófilos (mm ³)	--	1800-8000	3979.3 (3781.5-4187.5)	2 (1.2)	1 (0.62)	4100.9 (3860.0-4356.8)	1 (0.97)	2 (1.9)	0.45
Eosinófilos (mm ³)	--	0-400	268.6 (240.1-300.5)	--	39 (24.1)	239.6 (204.7-280.4)	--	21 (20.4)	0.24
Linfocitos (mm ³)	--	1200-5200	2450.3 (2358.7-2541.8)	2 (1.2)	--	2330.2 (2206.8-2453.7)	7 (6.8)	--	0.12
Monocitos (mm ³)	--	0-800	453.0 (429.3-478.0)	--	6 (3.7)	463.4 (428.4-501.3)	--	6 (5.8)	0.39

Los valores de p fueron obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney. $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. F: femenino; M: masculino; MG: media geométrica; IC (95%): intervalo de confianza al 95%.

Referente a la fórmula blanca, se observó que en la población de estudio se presentaron alteraciones en el conteo de eosinófilos, el 24.1% de individuos estaba por arriba del rango de referencia en el primer muestreo y el 20.4% para el segundo muestreo. Yaqub et al. (2014) reportaron diferencias en el porcentaje de neutrófilos, linfocitos y eosinófilos en una población de agricultores expuestos ocupacionalmente a plaguicidas, además, se observó que el porcentaje de neutrófilos fue menor en la población expuesta; mientras que la frecuencia de linfocitos y eosinófilos fue mayor respecto a un grupo no expuesto. Estos datos son consistentes con los reportados en otras poblaciones ocupacionalmente expuestas (Emam et al., 2012; Aroonvilairat et al., 2015; Arshad et al., 2016). Hasta el momento no se han descrito los posibles mecanismos específicos por los cuales la exposición a plaguicidas pudiera ocasionar daño a nivel hematológico, no obstante, Fareed et al. (2013) proponen que alteraciones en el conteo de glóbulos rojos y en el contenido de hemoglobina podría deberse a una alteración en el tejido eritropoyético por los plaguicidas.

Los parámetros bioquímicos evaluados en la población del estudio, se encontraron dentro del rango de referencia para una población mexicana. Sin embargo, se observó un incremento en glucosa, urea, BUN, creatinina y triglicéridos en el segundo muestreo respecto al primero. Mientras que se observó una disminución del colesterol en el segundo muestreo (Tabla 11). Adicionalmente, se analizó a los individuos que participaron en ambos muestreos (n=74) y se observó la tendencia descrita anteriormente (Tabla 12). Al respecto, Sudjaroen y Suwannahong (2017), reportaron un aumento en la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en una población de agricultores expuestos a plaguicidas. Sin embargo, los autores no encontraron una asociación con la exposición a estos compuestos. En este mismo sentido, Araoud et al. (2012) reportaron mayores niveles de creatinina y ácido úrico, así como una menor concentración de creatinina en una población de agricultores de Túnez expuesta a plaguicidas. Por otro lado, El-Nahhal et al. (2016) reportaron una alteración en el perfil lipídico, particularmente un aumento de triglicéridos y colesterol en agricultores de la región de Gaza, Palestina después de una exposición a plaguicidas, principalmente a POF. En este sentido, estudios *in vivo* han evidenciado alteraciones en el perfil lipídico después de la exposición a plaguicidas (Karami et al., 2016; Tian et al., 2017;

Aroonvilairat et al., 2018), Mu et al. (2015) observaron en un modelo *in vivo* una disminución en los niveles de colesterol después de una exposición al fungicida difenoconazol y lo atribuyen a una modificación en la transcripción de los genes involucrados en la expresión de proteínas relacionadas con la colesterosis.

De acuerdo con los resultados de este estudio, no se observó una asociación entre los niveles de glucosa y la exposición a plaguicidas. Sin embargo, algunos estudios han reportado alteraciones en los niveles de glucosa en poblaciones expuestas a POF (Androutsopoulos et al., 2013; Debost-Legend et al., 2016). Así también en modelos *in vivo*, se reportó un aumento en la concentración de glucosa tras la exposición a malatión, y sugirieron que esta alteración podría atribuirse a una mayor producción de glucosa hepática por la sobreestimulación de enzimas implicadas en la glucogenólisis (como la glucógeno-fosforilasa) o la neoglucogénesis (como la fosfofructoquinasa) en hígado o tejido muscular (Ramírez-Vargas et al., 2018). También se han reportado posibles alteraciones en la concentración de glucosa debido a lesiones hepáticas después de la exposición a plaguicidas en modelos *in vivo* y en poblaciones expuestas ocupacionalmente a diazinón, clorpirifos, monocrotofos, acefato y paratión (Bissell et al., 2001; Ghafour-Rashidi et al., 2007; Lassiter et al., 2008; Sodhi et al., 2008; Acker y Nogueira, 2012; Joshi y Rajini, 2012; Raafat et al., 2012). Respecto a la influencia de la exposición a plaguicidas sobre los parámetros renales, El-Nahhal et al. (2016) observaron un aumento en la concentración de urea, ácido úrico y creatinina en una población de agricultores palestinos expuesta a POF de forma crónica. Los resultados sugieren que una exposición prolongada a estos plaguicidas podría influir en una alteración en la función renal. Estos hallazgos son similares a otros estudios realizados en poblaciones expuestas (Sarhan y Al-Sahhaf, 2011; Aroonvilairat et al., 2015; Gaikwad et al., 2015; Hassanin et al., 2018). Por otro lado, un estudio *in vivo*, en ratones expuestos a POF reportaron un incremento en el nivel de creatinina como resultado del deterioro de la función glomerular y daño tubular en el riñón (Mohseen, 2001). Esta nefrotoxicidad inducida por los plaguicidas puede deberse al estrés oxidativo que causa daño en la membrana celular y enzimas específicas con pérdida de la fluidez y función renal (Mohseen, 2001; Kalender et al., 2007).

Tabla 11. Parámetros de química sanguínea en la población de estudio

Parámetro	Rango de referencia (mg/dL)	Primer muestreo (n=162)			Segundo muestreo (n=103)			p
		MG (IC 95%)	Nivel bajo n (%)	Nivel alto n (%)	MG (IC 95%)	Nivel bajo n (%)	Nivel alto n (%)	
Glucosa	70-115	75.1 (72.7-77.5)	56 (34.6)	6 (3.7)	98.4 (91.8-105.5)	11 (10.6)	25 (24.0)	<0.01
Urea	10-50	21.2 (20.2-22.3)	2 (1.2)	1 (0.62)	23.9 (22.5-25.4)	--	2 (1.92)	<0.01
BUN	4.7-23.3	9.9 (9.4-10.4)	2 (1.2)	2 (1.2)	11.2 (10.6-11.9)	--	2 (1.9)	<0.01
Creatinina	0.5-1.5	0.66 (0.63-0.68)	4 (2.5)	1 (0.6)	0.69 (0.66-0.73)	2 (1.9)	1 (1.0)	0.06
Ácido úrico	2.4-5.7	4.36 (4.2-4.6)	1 (0.62)	30 (18.5)	4.27 (4.05-4.51)	--	19 (18.3)	0.55
Colesterol	101-200	184.7 (179.2-190.3)	1 (0.6)	57 (35.2)	170.2 (163.7-177.0)	--	23 (22.1)	<0.01
Triglicéridos	50-200	135.5 (125.9-145.9)	2 (1.2)	32 (19.8)	159.0 (144.7-174.6)	--	31 (29.8)	0.01

Los valores de p fueron obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Tabla 12. Parámetros de química sanguínea en los individuos que participaron en ambos muestreos

Parámetros	Rango de referencia (mg/dL)	Primer muestreo Media (IC 95%)	Segundo muestreo Media (IC 95%)	<i>p</i>
Glucosa	70-115	77.6 (73.9-81.4)	102.4 (94.6-110.8)	<0.01
Urea	10-50	21.9 (20.28-23.74)	24.10 (22.37-25.96)	<0.01
BUN	4.7-23.3	10.25 (9.48-11.09)	11.26 (10.45-12.13)	<0.01
Creatinina	0.5-1.5	0.67 (0.63-0.71)	0.70 (0.66-0.75)	<0.01
Ácido úrico	2.4-5.7	4.42 (4.16-4.70)	4.55 (4.27-4.82)	0.81
Colesterol	101-200	198.11 (189.83-206.38)	173.53 (165.58-181.86)	<0.01
Triglicéridos	50-200	158.80 (143.50-175.74)	163.80 (145.65-184.22)	0.37

Los valores de *p* fueron obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney. $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativo.
IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

Respecto a la influencia de la exposición a plaguicidas sobre los parámetros renales, El-Nahhal et al. (2016) observaron un aumento en la concentración de urea, ácido úrico y creatinina en una población de agricultores palestinos expuesta a POF de forma crónica. Los resultados sugieren que una exposición prolongada a estos plaguicidas podría influir en una alteración en la función renal. Estos hallazgos son similares a otros estudios realizados en poblaciones expuestas (Sarhan y Al-Sahhaf, 2011; Aroonvilairat et al., 2015; Gaikwad et al., 2015; Hassanin et al., 2018). Por otro lado, un estudio *in vivo*, en ratones expuestos a POF reportaron un incremento en el nivel de creatinina como resultado del deterioro de la función glomerular y daño tubular en el riñón (Mohseen, 2001). Esta nefrotoxicidad inducida por los plaguicidas puede deberse al estrés oxidativo que causa daño en la membrana celular y enzimas específicas con pérdida de la fluidez y función renal (Mohseen, 2001; Kalender et al., 2007).

En este estudio, se observó la presencia de hemoglobina (28.1%), células eritrocitarias (23.5%) y proteínas en orina (13.7%) durante el primer muestreo (Tabla 13). Esta misma tendencia se mantuvo al realizar el análisis únicamente con los individuos que participaron en ambos muestreos. La presencia de proteínas en orina es un importante biomarcador de posible daño renal, relacionado con alteraciones glomerulares o el túbulo renal (Julian et al., 2009). Al respecto, un estudio en una población de jornaleros huicholes dedicados al corte y ensarte en campos tabacaleros de Santiago Ixcuintla, Nayarit reportaron la presencia de afecciones en las vías urinarias (Gamlin, 2013). Se ha reportado que un aumento de glóbulos rojos y blancos en orina podría estar asociado con infecciones del tracto urinario (Khadra et al., 2000). En este sentido, estudios en poblaciones han asociado la exposición a plaguicidas como un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades del tracto urinario y renal (Hassanin et al., 2018; Neghab et al., 2018).

Tabla 13. Parámetros del examen general de orina en la población de estudio

Parámetro	Primer muestreo n (%)	Segundo muestreo n (%)	<i>p</i>
Hemoglobina			
Negativo	110 (71.90)	65 (71.43)	0.80
Positivo			
+1	22 (14.38)	10 (10.99)	
+2	9 (5.88)	7 (7.69)	
+3	4 (2.61)	2 (2.20)	
+4	8 (5.23)	7 (7.69)	
Eritrocitos			
0xC	117 (76.47)	67 (72.83)	0.52
≥1xC	36 (23.53)	25 (27.17)	
Leucocitos			
≤3xC	137 (89.54)	87 (94.57)	0.17
>3xC	16 (10.46)	5 (5.43)	
Proteínas			
Negativo	132 (86.27)	87 (94.57)	0.04
Positivo	21 (13.73)	5 (5.43)	
Bacterias			
Escasas	109 (71.24)	69 (75.00)	0.37
Moderadas	27 (17.65)	15 (16.30)	
Abundantes	9 (5.88)	7 (7.61)	
Muy abundantes	8 (5.23)	1 (1.09)	
Nitritos			
Negativo	143 (93.46)	82 (89.13)	0.23
Positivo	10 (6.54)	10 (10.87)	

Los valores de *p* fueron obtenidos por la prueba de χ^2 . Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6.4 Actividad de las colinesterasas en la población de estudio

6.4.1 Actividad acetilcolinesterasa

La actividad AChE en la población de estudio fue de 25.47 U/g Hb (IC 95%: 24.46-26.52) para el primer muestreo y 32.50 U/g Hb (IC 95%: 31.24-33.82) para el segundo muestreo, ambas actividades se encuentran dentro del rango de referencia (Figura 8) (19-32 U/g Hb). El análisis por sexo y muestreo mostró una menor actividad AChE durante el primer muestreo tanto en hombres (24.43 U/g Hb) como en mujeres (26.28 U/g Hb) (Figuras 8b y 8c). No se observaron diferencias en la actividad AChE de acuerdo con el tipo de cultivo en el que se emplean los jornaleros en los campos agrícolas, ni en cuanto al tiempo que llevan trabajando en el campo (datos no mostrados).

Durante el primer muestreo se observó que el 14.20% de la población presentó actividad AChE por encima del valor de referencia establecido, y la mayor proporción (86.96%) fueron mujeres. Para el segundo muestreo, se observó un aumento de la frecuencia de individuos (40.78%) con actividad AChE mayores al límite establecido (32 U/g de Hb), en el cual la población femenina representa el 69.05%. En contraste, únicamente se observó que el 8% de la población presentaron actividad AChE por debajo del nivel de referencia para el primer muestreo. Con base en el primer muestreo y los tiempos de siembra reportados por SAGARPA (noviembre a febrero) se observó que el periodo en el cual se involucró la mayoría de la población en las actividades de campo fue noviembre de 2016 a febrero de 2017; correspondiente al primer muestreo. Estos datos son consistentes con la disminución de la actividad AChE, durante el primer muestreo (diciembre de 2016) en comparación con el segundo (entre abril y mayo de 2017).

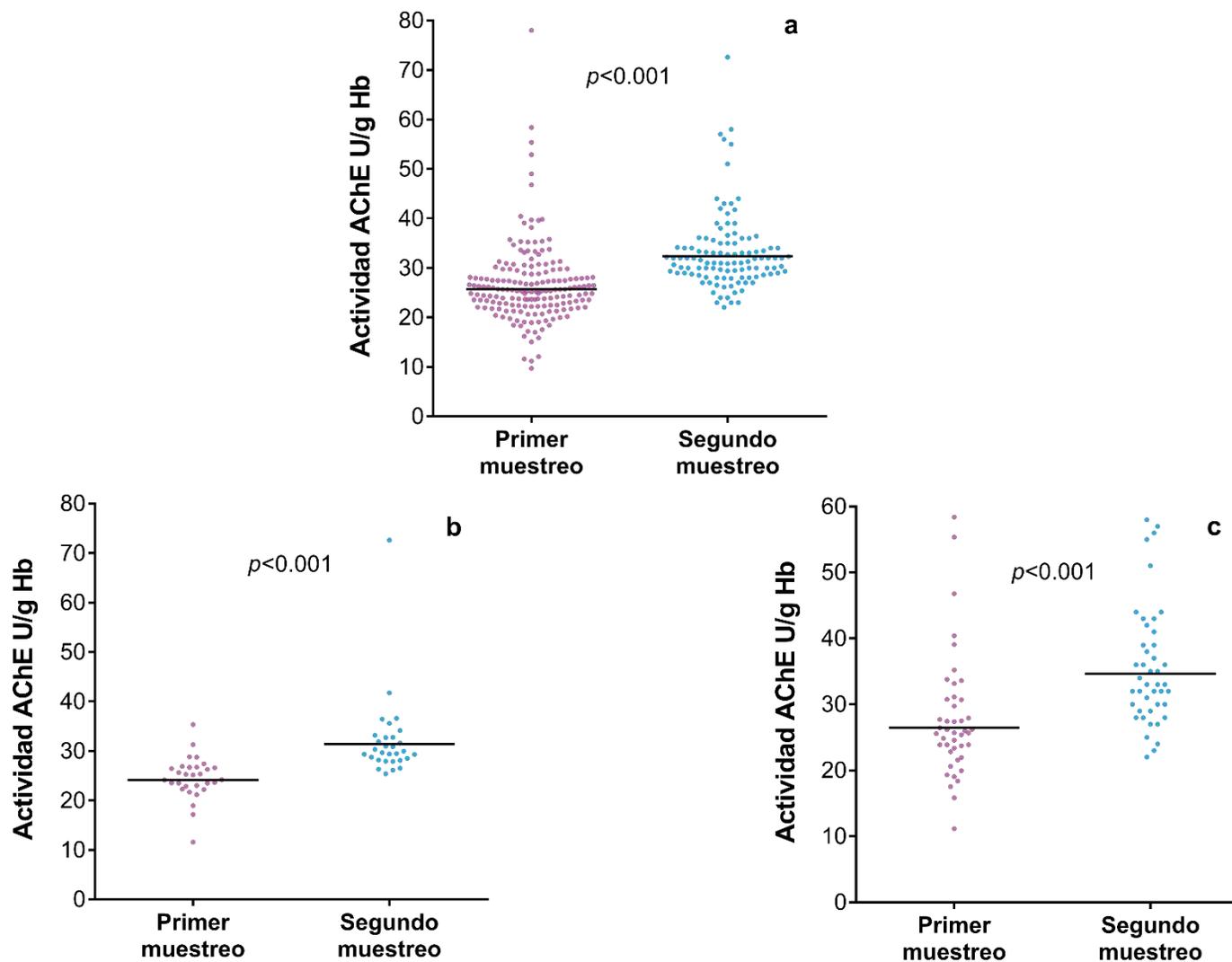


Figura 8. Actividad AChE en la población de estudio durante el primer y segundo muestreo. Población total (a), sexo masculino (b) y sexo femenino (c).

La inhibición de la actividad AChE por exposición a POF y CB ha sido ampliamente reportada en diversas poblaciones expuestas a plaguicidas (Atreya et al., 2012; Pasioni et al., 2012; Mwila et al., 2013; Neupane et al., 2014; Sapbamrer y Nata, 2014; Hongsibsong et al., 2017; Suárez-López et al., 2018). Al respecto, Silvério et al. (2017) reportaron una disminución de la actividad AChE en el 63.8% de una población expuesta ocupacionalmente a mezclas de POF. Nganchamung et al. (2017) observaron una asociación entre la actividad AChE y la exposición a POF en agricultores que trabajaban en cultivos de chile en Estados Unidos, donde se observó que el 50% de la población presentó valores por debajo del rango de referencia establecido para esta actividad. Asimismo, estos autores observaron una disminución en la actividad AChE con respecto al incremento en el tiempo trabajando en el cultivo de chile y la frecuencia de uso de plaguicidas. Por su parte, Bianco et al. (2017), observaron una menor actividad AChE en agricultores expuestos a mezclas de plaguicidas. En contraste, Cotton et al. (2018), no encontraron diferencias significativas en la actividad AChE en agricultores de Estados Unidos expuestos ocupacionalmente a mezclas de POF respecto a un grupo no expuesto ocupacionalmente. Estos resultados sugieren que el uso continuo de plaguicidas, así como una co-exposición, son factores que influyeron en el comportamiento de la actividad.

Al realizar la discriminación por sexo en la actividad AChE, se observó que en ambos grupos de este estudio se mantiene una disminución significativa en la actividad AChE en el primer muestreo respecto al segundo. Adicionalmente, se evaluaron las posibles asociaciones entre la actividad AChE con variables como edad, IMC, hábitos nocivos (fumar, consumo de alcohol o drogas) o dieta (consumo de macro y micronutrientes), sin embargo, no se observaron asociaciones significativas. Al respecto, estudios en poblaciones expuestas a plaguicidas hacen referencia que diversos factores pueden influenciar la actividad AChE, además de la exposición a éstos, como son el uso de anticonceptivos en mujeres, anemia, diabetes mellitus tipo I o hemoglobinuria paroxística nocturna, consumo de medicamentos como la galantamina, donepezil, entre otros (Jun et al., 2009; Čolović et al., 2013; Grieg et al., 2014; Pohanka, 2014; Assis et al., 2018).

6.4.2 Actividad butirilcolinesterasa

El promedio de la actividad BuChE en la población fue de 4232.98 U/L, la cual se encontró dentro del rango de referencia establecido. La actividad BuChE en el primer muestreo (4099.81 U/L) fue menor con respecto al segundo (4458.99 U/L) (Figura 9a). Tanto en hombres (4192.00 U/L) como en mujeres (4032.72 U/L) se observó una menor actividad BuChE para el primer muestreo (Figuras 9b y 9c). Además, en este mismo periodo el 16.67% de la población presentó valores de actividad BuChE por encima del valor de referencia, particularmente los hombres (70.37%). Para el segundo muestreo se observó un aumento de la frecuencia (23.08%) de individuos con valores mayores al límite establecido y 60.50% fueron hombres. Los resultados de las actividades AChE y BuChE, fueron los esperados con base en los periodos de siembra que reportó SAGARPA para los tiempos de muestreo, corroborando que el periodo de alta exposición fue durante el primer muestreo.

Diversos estudios han reportado la inhibición de la actividad BuChE por exposición a plaguicidas anticolinesterásicos principalmente a POF y CB (Strelitz et al., 2014; Dhananjayan et al., 2012; Krenz et al., 2014; Batool et al., 2017; Wongta et al., 2018). Sin embargo, aún son escasos los estudios en poblaciones indígenas que han evaluado la actividad BuChE. Al respecto, Bernal-Hernández et al. (2014) reportaron una actividad BuChE en indígenas huicholes expuestos particularmente a POF (3841.27 U/L), similar a la encontrada en el presente estudio. No obstante, se debe tener en cuenta que diversos factores, además de la exposición, pueden modular la actividad BuChE dentro de los que se encuentran el sexo, edad, IMC, estado fisiológico como la desnutrición, embarazo y algunas anemias, así como, el uso de anticonceptivos orales en mujeres (Assis et al., 2018; Ramírez-Santana et al., 2018).

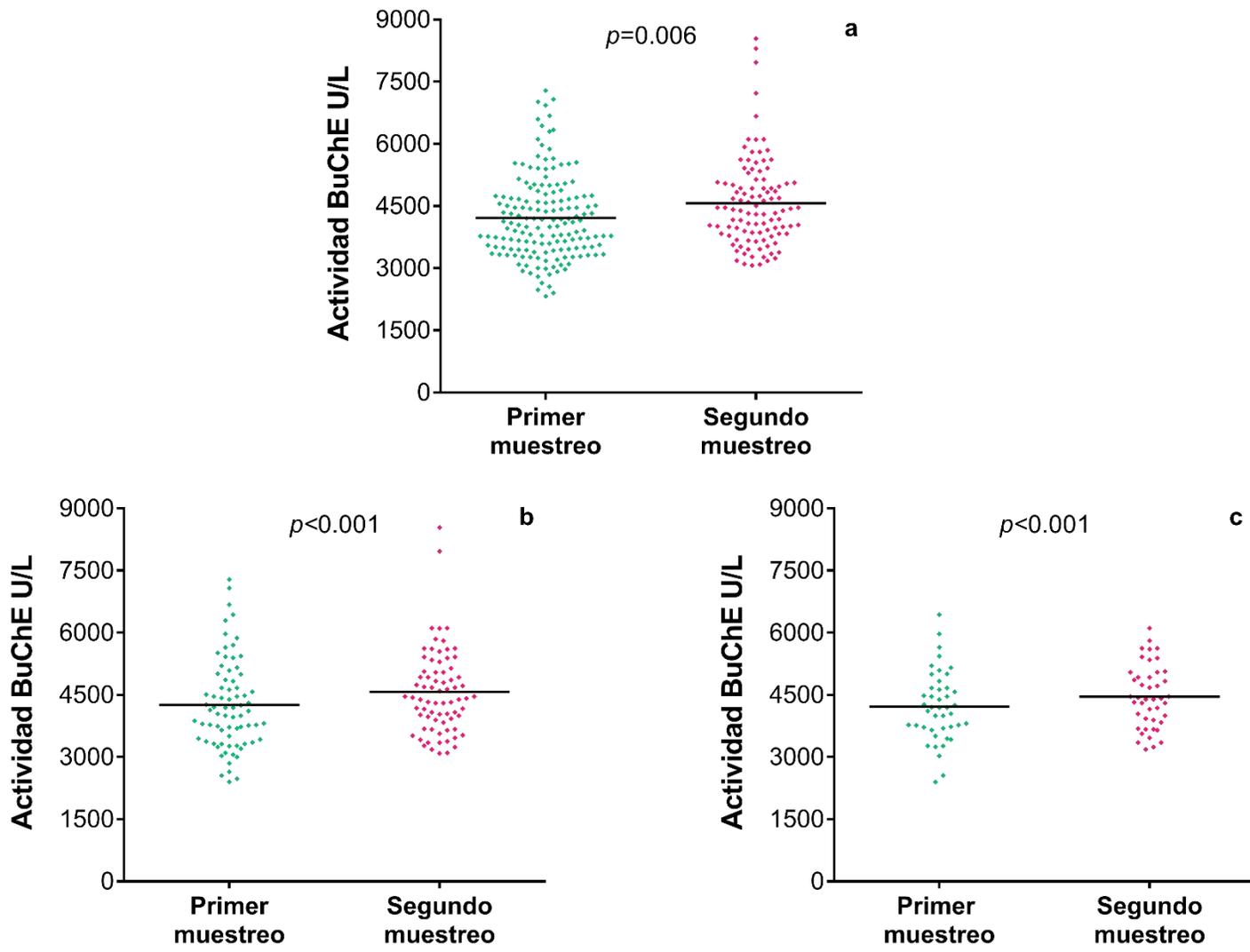


Figura 9. Actividad BuChE en la población de estudio durante el primer y segundo muestreo. Población total (a), sexo masculino (b) y sexo femenino (c).

No se observó correlación entre las actividades AChE y BuChE (datos no mostrados). Sin embargo, se observó una correlación positiva con el IMC de la población de estudio. Al respecto, ha sido descrito la posible función de la BuChE en la hidrólisis de la grelina (hormona del apetito) con un mecanismo de acción directo de la BuChE en el metabolismo de los lípidos y el aumento de peso (Brimijoin et al., 2016; Assis et al., 2018); estos datos se han reportado en estudios *in vivo*, en los que se observa un aumento en la actividad BuChE respecto al aumento de peso (Brimijoin et al., 2016; Chen et al., 2016; Chen et al., 2017).

6.5 Concentración de DAP como biomarcador de exposición a POF

Con el fin de determinar la dosis interna por exposición a POF en la población de estudio, se evaluó la concentración de los metabolitos DAP en 97 muestras de orina. El metabolito encontrado en mayor concentración fue el DMTP con una MG de 24.54 ng/mL, un valor mínimo de 11.73 ng/mL y máximo de 139.32 ng/mL, seguido del DMP con una MG de 9.93 ng/mL, un valor mínimo de 5.83 ng/mL y máximo de 29.05 ng/mL (Tabla 14). De acuerdo con los nombres comerciales de los plaguicidas mencionados por la población, estos metabolitos podrían hacer referencia a la exposición específica a dimetoato, azinfos metil y metil paratión.

Los metabolitos cuantificados en este estudio, son similares a los reportados recientemente por Herrera-Moreno (2018), en una población de fumigadores urbanos del estado de Nayarit, los autores refieren que el metabolito con mayor concentración fue DMTP (19.17 ng/mL), así los datos sugieren que el valor medio de dosis interna para este metabolito se encuentra más alto en la población de jornaleros huicholes pertenecientes al mismo estado. Además, la alta concentración de metabolitos dimetilos en ambas poblaciones está relacionado con el tipo de POF que refieren utilizar. La presencia de estos metabolitos se puede deber principalmente a la exposición a dimetoato, azinfos metílico y metil paratión, plaguicidas que fueron referidos por los indígenas huicholes. En contraste, Herrera-Moreno et al. (2019) encontró como principales plaguicidas malatión, metamidofos y dimetoato. Asimismo, diversos estudios han reportado la concentración de DAP en diferentes poblaciones

expuestas a POF (Hanchenlaksh et al., 2011; Kavvalakis y Tsatsakis, 2012; Ueyama et al., 2012; Koureas et al., 2014; Rohitrattana et al., 2014; Nagami et al., 2017; Silvério et al., 2017). Sapbamrer et al. (2016) evaluaron la presencia de DAP en agricultores de Tailandia y determinaron que el DEP fue el metabolito más abundante (51.2%), seguido por el DETP (38.1%) y un promedio de \sum DAP de $10.93 \pm 19.64 \mu\text{g/g}$ de creatinina. Por su parte, Berman et al. (2016) encontraron que los metabolitos más abundantes en una población israelita vegetariana fueron el DMP ($19.2 \mu\text{g/g}$ de creatinina) DMTP ($8.94 \mu\text{g/g}$ de creatinina) y DEP ($5.02 \mu\text{g/g}$ de creatinina).

No se observaron diferencias significativas de acuerdo al sexo y edad con presencia de metabolitos; así tampoco, se observó correlación con otros biomarcadores de exposición como las actividades de colinesterasas (datos no mostrados). Tampoco se observaron diferencias en la concentración de DAP entre individuos que afirmaron trabajar en el campo y los que realizaban otras actividades (Figura 10). No obstante, se encontró una correlación positiva entre la cantidad de plaguicida aplicado en el campo y la \sum DEP presente en la población de estudio (Figura 11). Estos resultados pudieran explicarse por la cercanía de los cultivos con las viviendas en la comunidad; ya que la mayoría de los individuos que trabajaban en el campo afirmaron que los cultivos se encontraban cerca de sus viviendas y, por tanto, pareciera que la exposición ambiental es constante en toda la comunidad.

Tabla 14. Concentración de alquilfosfatos en orina de la población de estudio

Analito	LD	LQ	MG (ng/mL)	IC (95%)	Mediana (ng/mL)	Percentiles (ng/mL)			Máximo (ng/mL)
						25%	75%	95%	
DMP	1.33	4.42	10.6	5.8-19.5	9.9	7.4	12.4	29.1	29.1
DMTP	1.60	5.32	28.1	25.2-31.5	24.5	18.8	39.6	88.8	139.3
DMDTP	0.97	3.22	0.9	0.7-1.2	0.7	0.5	1.6	2.2	3.8
ΣDMP			29.0	25.9-32.4	25	19.1	39.6	88.8	139.3
DEP	6.77	22.55	5.2	4.8-5.7	4.8	3.9	6.3	14.0	23.4
DETP	0.27	0.89	4.4	4.0-4.7	4.1	3.4	4.9	13.2	15.0
DEDTP	1.49	4.95	0.8	0.7-0.9	0.8	0.6	1.0	2.2	2.7
ΣDEP			9.6	8.8-10.5	9.1	7.5	11.0	27.4	32.6
ΣDAP			39.6	35.8-43.7	36.6	27.8	51.2	98.2	147.4

LD: límite de detección; LQ: límite de cuantificación; MG: media geométrica; IC (95%): intervalo de confianza del 95%.

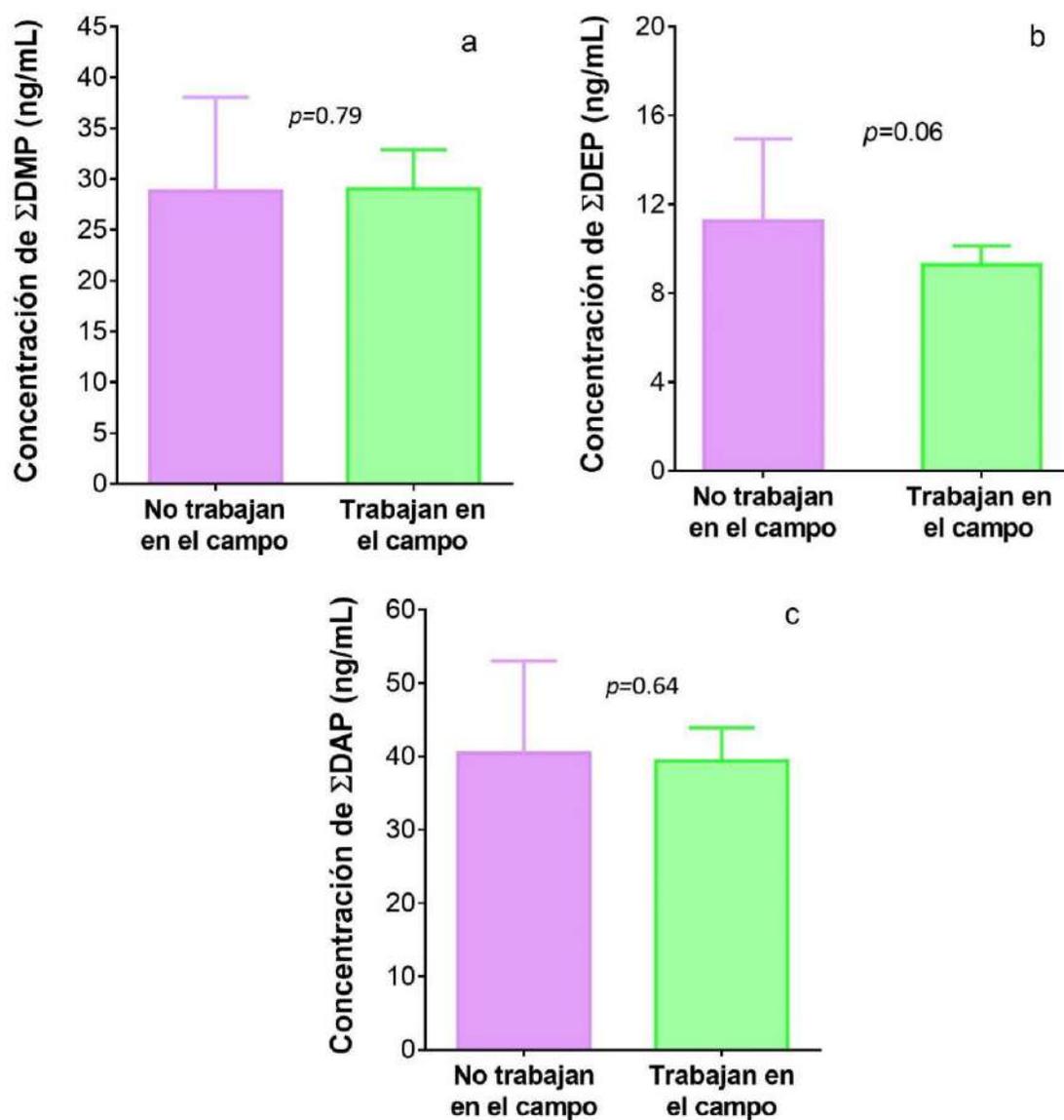


Figura 10. Comparación de la concentración de DAP entre la población que afirma trabajar en el campo y los individuos que realizan otras actividades. Σ DMP (a), Σ DEP (b) y Σ DAP (c).

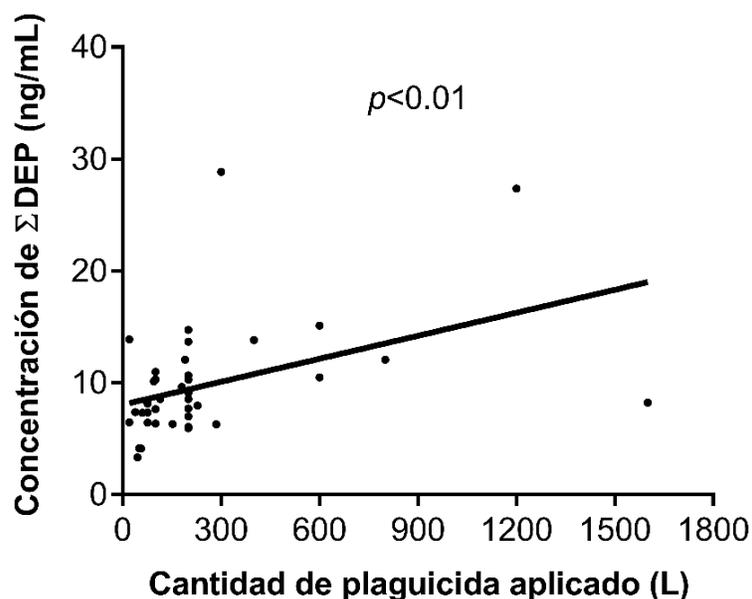


Figura 11. Correlación entre la cantidad de plaguicida aplicado y la concentración de Σ DEP en la población de estudio.

Al respecto, Bouvier et al. (2006) evaluaron la presencia de DAP en trabajadores de invernaderos, florerías y servicios de una escuela veterinaria expuestos ocupacionalmente a plaguicidas; sin encontrar diferencias en la concentración de estos metabolitos, respecto a un grupo no expuesto ocupacionalmente. En este mismo sentido, Arcury et al. (2016) no encontraron diferencias en la concentración de DAP entre sus grupos de estudio (agricultores y un grupo no expuesto). Runkle et al. (2013) observaron concentraciones similares de DAP entre una población femenina expuesta ocupacionalmente a plaguicidas y un grupo no expuesto. De acuerdo con Arcury et al. (2016), este comportamiento podría deberse a exposiciones no ocupacionales en el grupo no expuesto, dentro de las que se encuentran residuos de metabolitos en los alimentos y exposición ambiental como la aplicación reciente de plaguicidas para el control de plagas.

En el presente estudio se observó una correlación negativa entre la concentración de Σ DEP y el IMC (Figura 12). Al respecto, Sokoloff et al. (2016) reportaron diferencias significativas en la concentración de DAP según el IMC, con un aumento en la Σ DMP y Σ DMP en las mujeres que presentaron un IMC menor a 25 kg/m². Así mismo, Ranjbar

et al. (2015) reportaron un mayor IMC ($p < 0.05$) en el grupo de individuos que presentaron una concentración de DMTP superior al límite de detección.

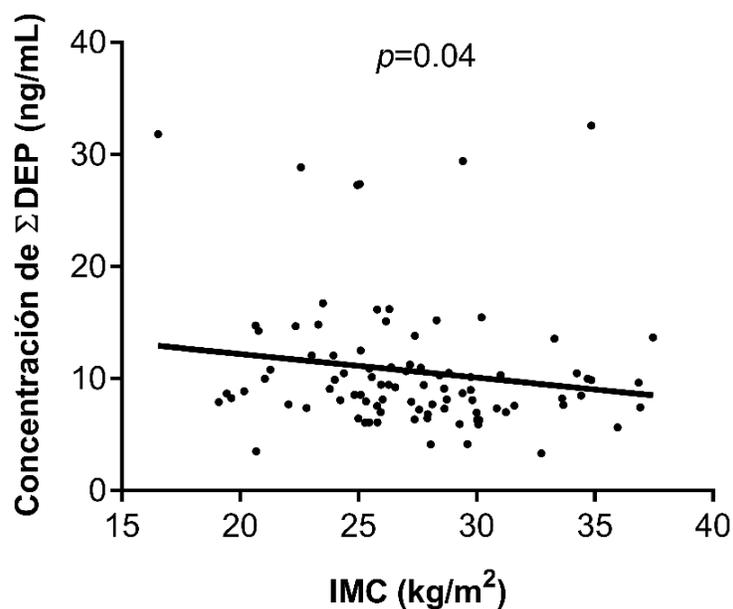


Figura 12. Correlación entre el índice de masa corporal y Σ DEP en la población de estudio.

Asimismo, se observaron correlaciones negativas entre el porcentaje de hematocrito y concentración de monocitos con la Σ DEP en la población de estudio (Figuras 13 y 14). Diversos estudios han evaluado las posibles variaciones en parámetros hematológicos asociadas con la exposición a diferentes tipos de plaguicidas principalmente POF, organoclorados y CB (Rastogi et al., 2008; Emam et al., 2012; Adad et al., 2015; Aroonvilairat et al., 2015; Sudjaroen, 2015; Arshad et al., 2016; Huang et al., 2016; Nassar et al., 2016).

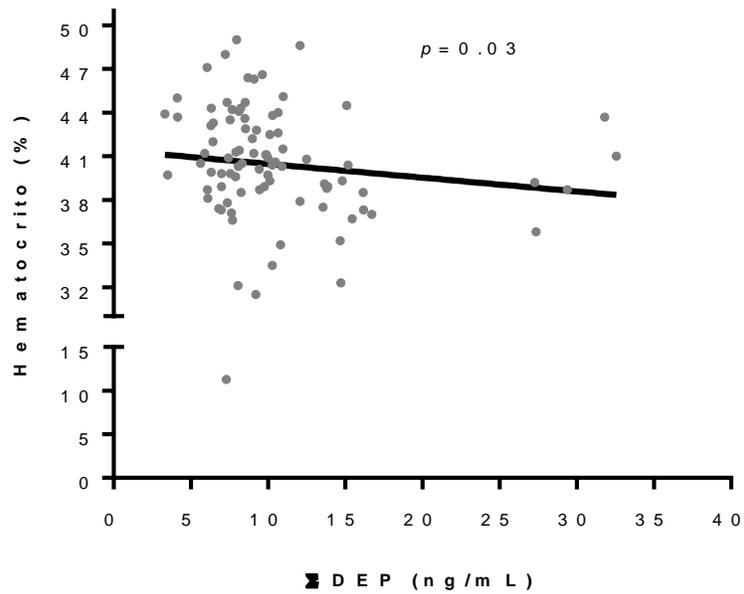


Figura 13. Correlación entre la concentración de Σ DEP y el porcentaje de hematocrito en la población de estudio.

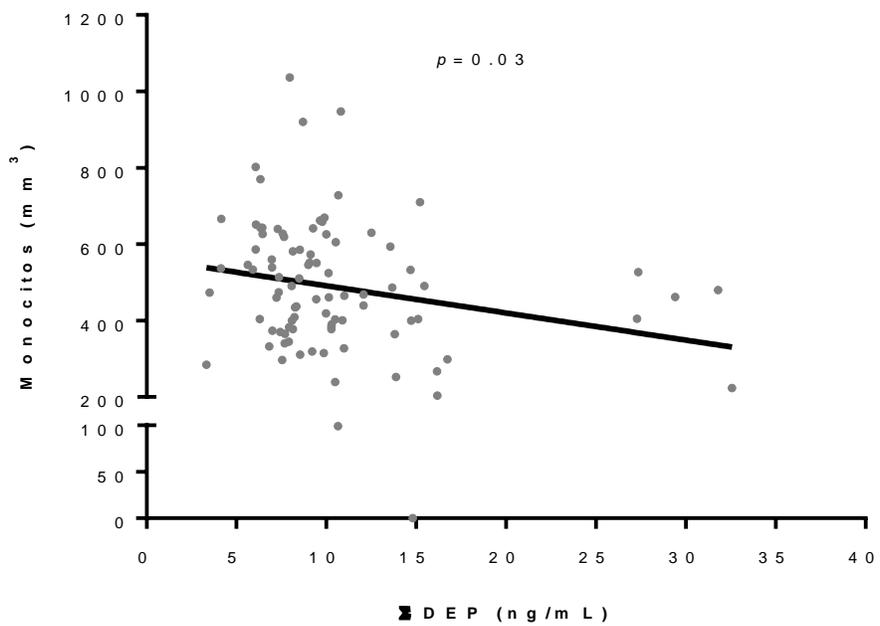


Figura 14. Correlación entre la concentración de Σ DEP y los niveles de monocitos en la población de estudio.

6.6 Metilación de genes específicos (*p15*, *p16* y *WRAP53*)

6.6.1 Gen *p15*

Cabe destacar, que este es el primer estudio en el cual se evalúa el patrón de metilación de este gen en poblaciones indígenas. Para el análisis del gen *p15*, se evaluaron 5 sitios CpG de la región 5'UTR. El promedio de metilación para los sitios evaluados fue de 4.42 %5mC (4.27-4.57), no se observaron diferencias en el perfil de metilación de este gen de acuerdo al sexo. Sin embargo, se observó un aumento en la metilación de *p15* (4.48 %5mC, 4.31-4.65) en los individuos que afirmaron haber trabajado en el campo respecto a los que realizaban otras actividades (4.11 %5mC, 3.80-4.44) (Figura 15a). Respecto al perfil de metilación de este gen de acuerdo con el IMC y hábitos nocivos, no se observaron diferencias significativas. En contraste, Herrera-Moreno et al. (2019) reportaron una asociación entre el perfil de metilación de *p15* con el IMC, sexo y la condición de fumador en una población mestiza expuesta ocupacionalmente a plaguicidas, sin embargo, se debe tener en cuenta que no se conoce el nivel basal de metilación en estas poblaciones, así también, estudios han evidenciado la influencia de la raza y la etnia en el patrón de metilación gen específico. Además de las diferencias en los niveles de plaguicidas, la influencia de la raza y etnia puede jugar un papel importante en el comportamiento de biomarcadores epigenéticos (Bryc et al., 2010; Liu et al., 2010; Barfield et al., 2014; Lapato et al., 2018).

Por otro lado, el análisis por sitio mostró un incremento en el %5mC en el grupo que trabaja en el campo (3.82 %5mC) con respecto al grupo de referencia (3.22 %5mC) para el primer sitio CpG analizado (Tabla 15). Se observaron correlaciones positivas entre los sitios CpG de *p15* (Tabla 16), lo que indica que todos los sitios analizados presentan el mismo comportamiento en la población de estudio. Con relación a las características generales de la población de estudio, se observó una correlación positiva entre el porcentaje de metilación del gen *p15* y la edad (Figura 16).

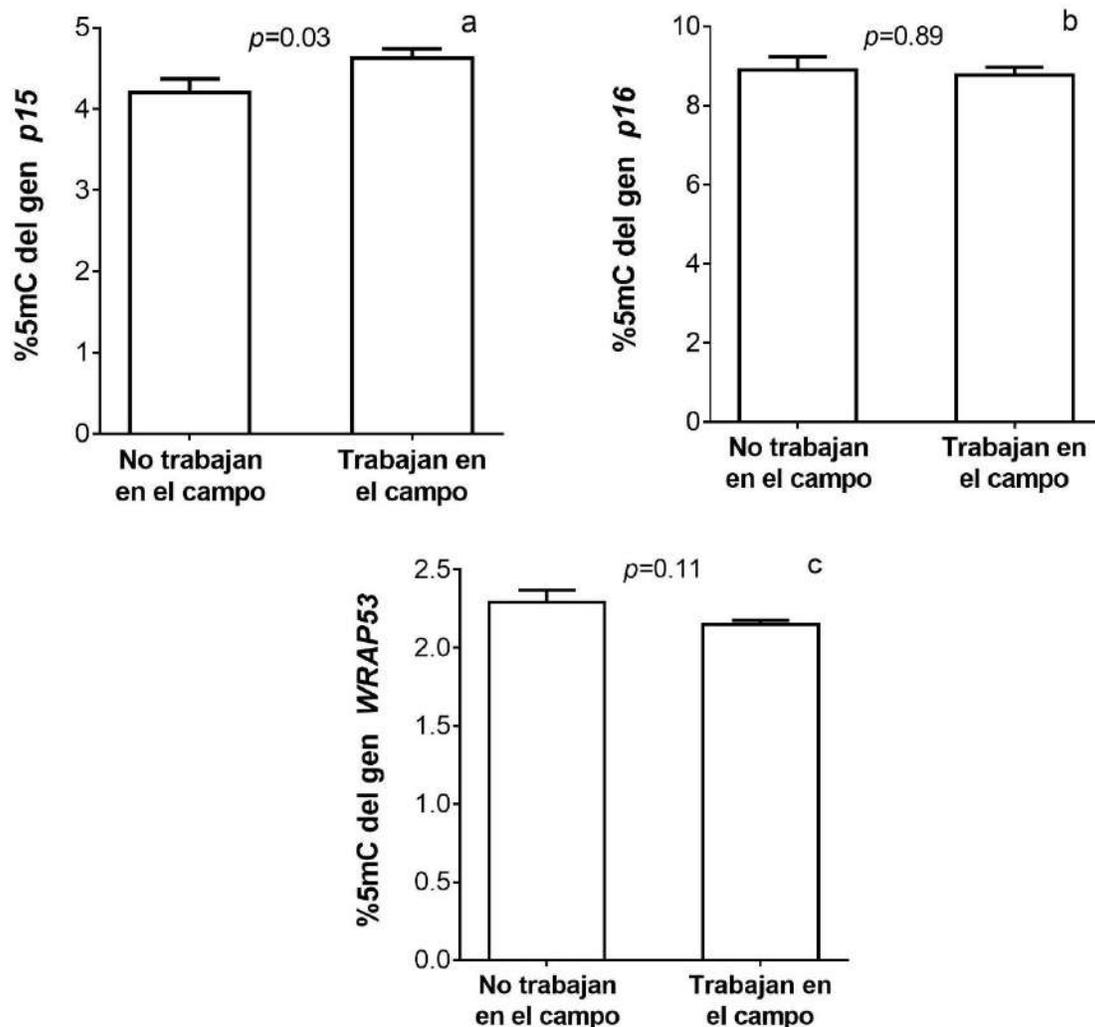


Figura 15. Metilación de los genes *p15* (a), *p16* (b) y *WRAP53* (c) en la población de estudio que trabaja en el campo y los individuos que realizan otras actividades.

Se ha reportado que el patrón de metilación del ADN cambia con el tiempo y que estos cambios pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad (Finkel et al., 2007). Una disminución en la metilación global del genoma a través de la edad, se ha relacionado con una reducción en la estabilidad del genoma y aumento de aberraciones cromosómicas, principalmente con el desarrollo de cáncer (Finkel et al., 2007; Gensous et al., 2017; Pérez et al., 2018).

Tabla 15. Porcentaje de metilación por sitio del gen *p15* en la población de estudio

Sitios analizados	No trabajan en el campo n=30		Trabajan en el campo n=154		<i>p</i>
	MG	IC (95%)	MG	IC (95%)	
CpG 1	3.22	2.92-3.56	3.82	3.65-4.01	<0.01
CpG 2	4.86	4.44-5.33	5.42	5.16-5.68	0.07
CpG 3	3.32	2.80-3.94	3.33	3.16-3.51	0.84
CpG 4	4.54	3.93-5.25	4.59	4.36-4.84	0.87
CpG 5	5.12	4.57-5.75	5.02	4.80-5.25	0.54

Los valores de *p* fueron obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney. $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Tabla 16. Correlación entre los sitios analizados para el gen *p15*

Sitios analizados	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5
CpG1	--	0.42*	0.66*	0.47*	0.36*
CpG2	0.42*	--	0.56*	0.56*	0.45*
CpG3	0.66*	0.56*	--	0.54*	0.65*
CpG4	0.47*	0.56*	0.54*	--	0.37*
CpG5	0.36*	0.45*	0.65*	0.37*	--

Los valores de *p* fueron obtenidos mediante la prueba de correlación de Spearman. * $p < 0.05$

Adicionalmente, en algunos genes se ha observado una hipermetilación especialmente en la región promotora (*IGHII*, *HIC1*, *CASP8*, *GSTP1*, *RASSF1A*, *CDKN2A*, entre otros) lo que hace a los individuos más susceptibles al desarrollo de ciertas enfermedades (Dammann et al., 2000; Yuan et al., 2008; Vidal et al., 2014; Jung y Pfeifer, 2015). Específicamente, la hipermetilación en el gen *p15* se ha asociado con el desarrollo de diferentes tipos de cáncer como linfomas, mielomas, cáncer colorrectal, entre otros (Nieminen et al., 2012; Abdel-Rahman et al., 2014; Krajnović et al., 2014; Liu et al., 2016).

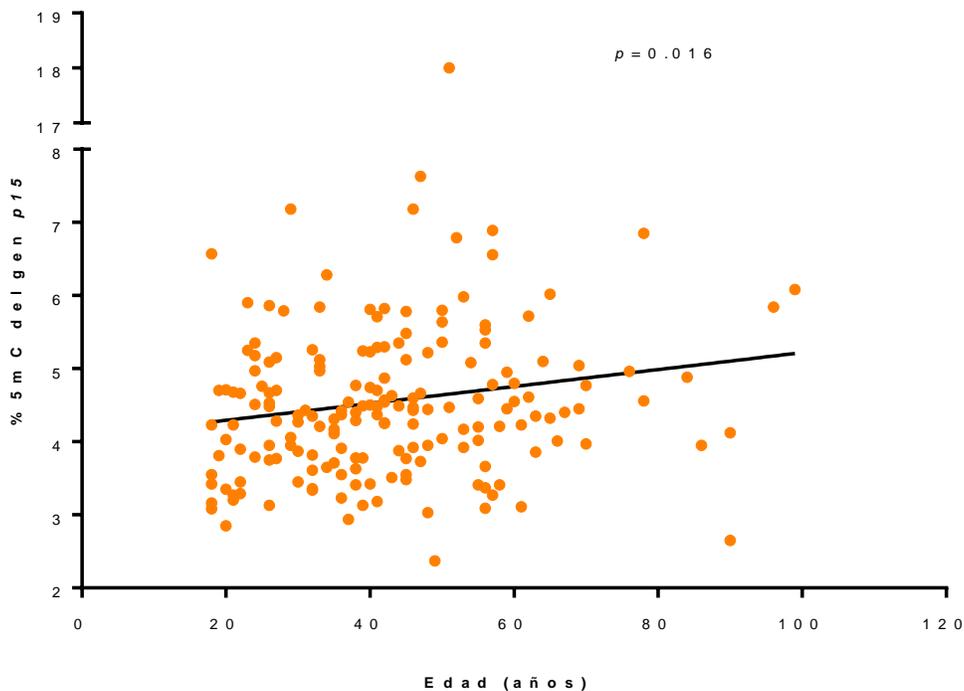


Figura 16. Correlación de la edad con la metilación del gen *p15* en la población de estudio.

Por otro lado, se ha evidenciado alteración en la actividad de la ADN metiltransferasa 1 (DNMT1), encargada de mantener los patrones de metilación del genoma a través de la edad; influyendo sobre el perfil de metilación global del ADN (Jung y Pfeifer, 2015). Otro mecanismo potencial de desmetilación es catalizado por las dioxigenasas metilcitosinas Tet (translocación 10-11) 1, 2 y 3 (TET 1, 2, 3), sin embargo, aún no se ha logrado elucidar el mecanismo por el cual se ven influenciadas las TET en el envejecimiento (Denis et al., 2011; Hahn et al., 2013; Jung y Pfeifer, 2015).

6.6.2 Gen *p16*

La secuencia analizada para este gen se ubicó en la región promotora proximal y se evaluaron 6 sitios CpG. El promedio de metilación fue de 8.39 %5mC (7.95-8.85). No se observaron diferencias en el promedio de metilación (Figura 15b) entre individuos que afirmaron trabajar en el campo y los que se dedican a otras actividades, ni por sitio analizado (Tabla 17). Tampoco se observaron diferencias con relación a hábitos nocivos, sexo o edad. En contraste, Herrera-Moreno et al. (2019) reportaron una

asociación entre el %5mC del gen *p16* con variables como el IMC, sexo, nivel de educación y el estatus de fumador en una población mestiza expuesta ocupacionalmente a plaguicidas.

Por otro lado, se observó una alta variabilidad en la correlación entre los sitios CpG evaluados, por lo cual se podría sugerir que la probabilidad que presenta cada uno de los sitios a ser metilado es distinto (Tabla 18). Al respecto estudios han confirmado que el perfil de metilación de cada sitio es independiente y puede variar drásticamente, aunque los sitios se encuentren de forma adyacente (Zou et al., 2006; Song et al., 2017); sin embargo, la razón de la posible variación entre sitios cercanos aún no ha sido definido.

Tabla 17. Metilación por sitio del gen *p16* en la población de estudio

Sitios analizados	No trabajan en el campo n=30		Trabajan en el campo n=154		<i>p</i>
	MG	IC (95%)	MG	IC (95%)	
CpG 1	3.22	2.92-3.56	3.82	3.65-4.01	<0.01
CpG 2	4.86	4.44-5.33	5.42	5.16-5.68	0.07
CpG 3	3.32	2.80-3.94	3.33	3.16-3.51	0.84
CpG 4	4.54	3.93-5.25	4.59	4.36-4.84	0.87
CpG 5	5.12	4.57-5.75	5.02	4.80-5.25	0.54

Los valores de *p* fueron obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney. Valores de *p*<0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Tabla 18. Correlación entre los sitios analizados para el gen *p16*

Sitios analizados	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6
CpG1	--	0.03	0.49*	0.13	0.41*	0.28*
CpG2	0.03	--	0.92*	0.97*	-0.02	-0.06
CpG3	0.49*	0.92*	--	0.91*	0.45*	0.18
CpG4	0.13	0.97*	0.91*	--	0.01	-0.06
CpG5	0.41*	-0.02	0.45*	0.01	--	0.33*
CpG6	0.28*	-0.06	0.18	-0.06	0.33*	--

Los valores de p fueron obtenidos mediante la prueba de correlación de Spearman. Valores de $*p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6.6.3 Gen *WRAP53*

Para el gen *WRAP53* se evaluaron 3 sitios CpG ubicados en la región codificante del exón 1 α y el primer intrón. El porcentaje de metilación en la población de estudio para este gen fue de 2.14 %5mC (2.09-2.19). En el análisis por sitio, se observó un menor porcentaje de metilación del sitio 3 en la población que afirmó haber trabajado en el campo, con respecto al grupo que no trabaja en el campo (Tabla 19), lo que sugiere que la alteración en el perfil de metilación de este gen, pudiera deberse a la exposición a plaguicidas. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario realizar estudios específicos de expresión con la cuantificación del ARN mensajero. No se observó correlación entre los sitios 1 y 3 (Tabla 20). Por otro lado, no se observaron diferencias entre los individuos que afirmaron trabajar en el campo y los que realizan otras actividades (Figura 15c). Así mismo, no se observaron diferencias de acuerdo con los hábitos nocivos, sexo o edad.

Tabla 19. Metilación por sitio del gen *WRAP53* en la población de estudio

Sitios analizados	No trabajan en el campo n=30		Trabajan en el campo n=159		<i>p</i>
	MG	IC (95%)	MG	IC (95%)	
CpG 1	1.02	0.90-1.16	1.01	0.97-1.05	0.58
CpG 2	3.12	2.90-3.35	2.90	2.81-2.99	0.08
CpG 3	2.64	2.48-2.82	2.44	2.36-2.52	0.03

Los valores de *p* fueron obtenidos por la prueba de U de Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Tabla 20. Correlación entre los sitios analizados del gen *WRAP53*

Sitios analizados	CpG1	CpG2	CpG3
CpG1	--	0.21*	0.12
CpG2	0.21*	--	0.72*
CpG3	0.12	0.72*	--

Los valores de *p* fueron obtenidos mediante la prueba de correlación de Spearman. Valores de $*p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En los últimos años, diferentes estudios han evidenciado como la exposición a compuestos tóxicos, como los plaguicidas y otros contaminantes ambientales, provocan modificaciones epigenéticas que podrían relacionarse con el desarrollo de diversas patologías (Smith et al., 2007; O'Hagan et al., 2011; Ho et al., 2012; Lardenoije et al., 2015; Chappell et al., 2016; Guintivano y Kaminsky, 2016; Wen et al., 2016; Ho et al., 2017; Palmisano y Pandey, 2017).

La mayoría de los estudios en los que se ha evaluado la exposición a plaguicidas en poblaciones, se han centrado en el estado de metilación global del genoma por la estimación del %5mC de secuencias altamente repetidas, como los Elementos Nucleares Intercalados Largos 1 (LINE-1, por sus siglas en inglés) (Rusiecki et al., 2008; Lind et al., 2013; Huen et al., 2014; Lee et al., 2017; Benítez-Trinidad et al., 2018; Jiménez-Garza et al., 2018).

Con referencia a estudios de metilación en el locus INK4 específicamente sobre los genes *p15* y *p16*, hasta el momento únicamente se ha publicado un artículo en poblaciones expuestas ocupacionalmente a plaguicidas por Herrera-Moreno et al. (2019), en el que se observó una disminución en el %5mC del gen *p15* en los fumigadores urbanos expuestos a plaguicidas; mientras que, para el gen *p16* se observó un incremento en el %5mC en un grupo de moderada exposición respecto al grupo de referencia. Sin embargo, en relación con la exposición a otros xenobióticos, Bollati et al. (2007) evaluaron el estado de metilación de la región promotora del gen *p15* en individuos expuestos a benceno que trabajaban en una estación de gasolina y observaron que los individuos expuestos tenían el doble porcentaje de metilación respecto al grupo de baja exposición. Así también, observaron una asociación positiva entre la concentración de benceno en aire y el %5mC del gen. Así mismo, Xing et al. (2010) observaron una disminución significativa de la expresión del gen *p15* en el 63% de la población expuesta a benceno, en comparación a un grupo no expuesto y una diferencia marginal en la expresión del gen *p16* en el 80% de los individuos expuestos.

Conocer la posible alteración en el porcentaje de metilación en genes supresores de tumores como *p15* y *p16* en poblaciones expuestas a plaguicidas es de gran importancia en la regulación de la proliferación celular y la senescencia. Las proteínas *p15* y *p16* son inhibidores de cinasas dependientes de la ciclina CDK4 y CDK6; de tal forma que previenen la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) y de esta forma regulan el progreso del ciclo celular de la fase G1 a S en momentos de estrés celular; por tanto, alteraciones en el patrón de metilación de estos genes podría implicar variaciones en el nivel de expresión de éstos y por tanto, una desregulación del ciclo celular en la fase anterior a la duplicación del ADN (Cánepa et al., 2007; Esquivel-Velázquez et al., 2015).

Respecto a *WRAP53*, Herrera-Moreno (2018) evaluó el %5mC en los mismos sitios CpG analizados en el presente estudio en una población de fumigadores urbanos expuestos principalmente a POF y reportó una diferencia significativa entre los grupos expuestos ocupacionalmente en comparación con un grupo de referencia. Por otra

parte, Kim et al. (2018), evaluaron el porcentaje de metilación en la región promotora de *WRAP53* en pacientes con cáncer de pulmón y reportaron un aumento en el perfil de metilación del gen en 12 de los individuos analizados. Esta alteración en el %5mC se asoció con una disminución en la transcripción del gen y se detectó principalmente en los individuos que se encontraban en los estadios II-III A del cáncer. Los estudios realizados en los que se evalúa el porcentaje de metilación en secuencias naturales antisentido son limitados (Tufarelli et al., 2003; Yu et al., 2008; Watanabe et al., 2010). Sin embargo, en los últimos años se ha evidenciado la importancia de estas secuencias, ya que cerca del 75% de la secuencia del genoma humano es transcrita ARN y sólo el 1.5% es atribuida a regiones exónicas que codifican para proteínas y el resto está conformado por regiones intrónicas y ARN no codificante. Las secuencias antisentido se caracterizan por ser transcritos de secuencia larga (ncRNA) que se sobrelapan sobre gen que codifica para una proteína, específicamente *WRAP53* se conoce como la secuencia antisentido del gen supresor de tumores *p53*. Los ARNm de *WRAP53* y *p53* se unen por complementariedad de bases y forman una unión estable que le brinda estabilidad y protección a la degradación al transcrito *p53* (Farnebo, 2009; Mahmoudi et al., 2009; Mahmoudi et al., 2010; Mahmoudi et al., 2011).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han asociado diversas alteraciones gen específico con exposición a plaguicidas (Zhang et al., 2012; Guerrero-Bosagna et al., 2014; Manikkam et al., 2014; Hernández-Cortes et al., 2018). Desaulniers et al. (2009) evaluaron el efecto de plaguicidas organoclorados en ratas en estado de gestación a diferentes concentraciones, y se observó que una mezcla de estos compuestos a una dosis de 5 mg/kg/día, se presentó una reducción del ARNm de *p16*, una disminución de la disponibilidad de S-adenosilmetionina (SAM), así como, una reducción de la metilación global del genoma. Adicionalmente, se reportó una diferencia significativa en el patrón de metilación de los 5 sitios CpG evaluados en la región promotora de *p16* entre las ratas expuestas a la mezcla y ratas no expuestas. Asimismo, Kostka et al. (2014), evaluaron el estado de metilación en la región promotora de *p16* de ratas después de exponerlas a DDT. El estudio mostró una alteración en el patrón de metilación del gen, evidenciándose un aumento en el %5mC en comparación con ratas no expuestas; así

también, se observó una disminución significativa en la expresión del gen en células hepáticas. En ese mismo trabajo, se observó que una sola dosis de DDT, incrementó significativamente la expresión de la actividad de las DNMTs, excediendo el valor basal en un 83%. Por otra parte, Kwiatkowska et al. (2017), observaron un aumento en el %5mC de *p16* en células mononucleares tratadas con glifosato, sin diferencias significativas con las células no expuestas.

Por otro lado, se realizaron análisis de asociación entre la frecuencia de consumo de macro y micronutrientes por la población de estudio y el perfil de metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53*, sin embargo, no se observaron asociaciones significativas para ninguna de las variables evaluadas. Diferentes estudios han reportado que los nutrientes pueden modificar los patrones de metilación del ADN tanto a nivel global como específico (Zhang et al., 2015; Friso et al., 2017; Tremblay et al., 2017; Zhou et al., 2017). Se han establecido tres mecanismos principales por los cuales la influencia de la nutrición puede llevar a que se den cambios en el patrón de metilación: 1) la provisión de sustratos que son necesarios para promover la metilación del ADN, 2) la provisión de cofactores que modulan la actividad enzimática de las DNMT y 3) cambios en la actividad de las enzimas que regulan el ciclo del carbono (Zhang et al., 2015). Dentro de los principales donadores de metilo que se encuentran en la dieta están la metionina, el folato, colina, betaína y vitaminas del complejo B (B2, B6 y B12). Estudios han observado que deficiencia en la dieta de nutrientes donadores de metilo, resulta en una hipometilación global del ADN, por el contrario, una dieta con alta presencia de estos micronutrientes incrementa la metilación del ADN en loci específicos (Craciunescu et al., 2010; Mehedint et al., 2010; Farkas et al., 2015). En este sentido, Herrera-Moreno et al. (2019) encontraron asociación entre el consumo de magnesio y el perfil de metilación del gen *p15*, mientras el porcentaje de metilación del gen *p16*, se asoció con el consumo de ácido fólico en una población de fumadores urbanos expuestos principalmente a POF.

En el presente estudio, se evaluaron las posibles asociaciones entre el perfil de metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53* con los biomarcadores de efecto y exposición, sin embargo, no se observó asociación con las actividades AChE o BuChE, así tampoco se observó algún cambio respecto a la concentración de DAP.

Cabe destacar que este es el primer estudio donde se evalúa el perfil de metilación en poblaciones indígenas de México, sin embargo, estudios en otras poblaciones han reportado variaciones en el patrón de metilación del ADN influenciado por la etnicidad y raza (Liu et al., 2010; Barfield et al., 2014; Lapato et al., 2018). Heyn et al. (2013) reportaron variaciones en el porcentaje de metilación del ADN en la región promotora de genes asociados con la variación humana natural como el metabolismo y transporte de xenobióticos (*GSTT1*, *GSTM5*, *ABCB11*), transductores del sabor (*TAS1R3*), procesamiento y adaptación (*ARNTL*, *PRSS3*); así como en factores de respuesta inmune (*CERK*, *LCK*, *CD226*) entre áfrico-americanos, americanos y asiáticos. Sus resultados sugieren una influencia en la variación de la metilación del ADN sobre el fenotipo por susceptibilidad al desarrollo de enfermedades, así como a la exposición de contaminantes ambientales. Adicionalmente, Galanter et al. (2017) evaluaron el patrón de metilación en individuos de diversos grupos étnicos latinoamericanos y reportaron diferencias en el patrón de metilación en varios loci a lo largo del genoma en los grupos de estudio, así como, una asociación significativa entre la etnicidad y el porcentaje de metilación del gen *ABO* presente en el cromosoma 3. Además, identificaron que la etnicidad está asociada con el patrón de metilación de diferentes sitios analizados e influencia de factores ambientales y sociales (Galanter et al., 2017).

6.6.4 Metilación de genes específicos, hábitos nocivos y dieta

En el presente estudio no se observó asociación entre el patrón de metilación de los genes evaluados y los hábitos nocivos como fumar, consumo de alcohol o drogas. En contraste con lo reportado por Herrera-Moreno et al. (2019) quienes observaron una asociación entre el %5mC de los genes *p15* y *p16* con el estatus de fumador en una población mestiza expuesta ocupacionalmente a plaguicidas. Otras investigaciones, han reportado ampliamente cómo el alcohol y el tabaco influyen en los perfiles de

metilación (Page et al., 2015; Kim et al., 2016; Liu et al., 2016; Berkel et al., 2017; Palmisano y Pandey, 2017). Referente al consumo de tabaco, Philibert et al. (2010) encontraron diferencias significativas entre el grupo de fumadores y no fumadores en los sitios analizados en la región 5'UTR del gen *MAOA*; igualmente, Xu et al. (2010) evidenciaron una asociación entre el patrón de metilación de la región promotora del gen *COMT* y el tabaquismo. En cuanto al consumo de alcohol, Bönsch et al. (2006), observaron un incremento significativo en la metilación a nivel global del ADN en individuos con alto consumo de alcohol.

En este estudio se evaluó la posible asociación entre la dieta y el perfil de metilación de los genes *p15*, *p16* y *WRAP53*; sin embargo, no se observó asociación entre los macro y micronutrientes que refirieron consumir con mayor frecuencia y el %5mC. En contraste, diversos estudios han encontrado asociación entre el perfil de metilación y el consumo de nutrientes (Ducker y Rabinowitz, 2016; McCullough et al., 2016; Friso et al., 2017).

6.7 Talleres sobre el uso de medidas de protección, manejo de plaguicidas y sus efectos en la población de estudio

Como parte de los compromisos con los participantes, una vez analizadas las muestras se entregaron los resultados de los análisis clínicos a la población de estudio. Asimismo, se realizaron talleres en cada una de las comunidades, acerca del uso, manejo y efectos asociados con la exposición a plaguicidas.

Los temas abordados durante la aplicación de los talleres fueron:

- ¿Qué son los plaguicidas?
- ¿Para qué se utilizan los plaguicidas?
- ¿Cuáles son los efectos tóxicos a la salud que generan los plaguicidas?
- ¿Cuáles son las principales medidas de protección que se deben tener para protegerse de los plaguicidas?
- Intercambio de experiencias que se han tenido con los plaguicidas

Durante los talleres se evidenció la falta de información que presentan estas comunidades, ya que es escaso o en algunos casos nulo el conocimiento que tienen los jornaleros acerca de los efectos tóxicos de los plaguicidas. Parte de esta falta de información es debida a la dificultad que tienen estas poblaciones para leer la información que se encuentra escrita en los envases de los plaguicidas. Díaz-Romo y Salinas-Álvarez (2002) explican que en la cultura wixárika, el cráneo con los huesos cruzados presente en los envases de plaguicidas, no se relaciona con peligro, ya que el símbolo de calaveras tiene un significado diferente para esta etnia, asociado especialmente con sus creencias. Por lo que la información que se quiere dar a conocer en los envases puede malinterpretarse en estas poblaciones.

Es de resaltar que durante el desarrollo de los talleres se observó un interés genuino por parte de los participantes. La mayoría de los individuos participó en el intercambio de preguntas, mostrando particular interés en cómo podían protegerse a sí mismos y a su familia. Con referencia al equipo personal de protección, la mayoría de los individuos varones expresó la inconformidad de utilizarlos, principalmente debido a las condiciones ambientales y a la falta de implementos adecuados para su protección durante la jornada laboral. Adicionalmente, se elaboraron trípticos traducidos al dialecto wixárika (ANEXO 1), los cuales fueron entregados a los asistentes a los talleres, con el fin de que los participantes lo compartieran con el resto de los individuos de sus comunidades, que por alguna razón no pudieron asistir a los talleres y también para que recordaran la información brindada. En los trípticos se incluyeron los siguientes temas: información acerca del equipo personal de protección, el significado de los colores de las etiquetas en los envases, las principales vías de entrada de los plaguicidas al organismo, instrucciones del lavado del equipo de fumigación, triple lavado de los envases, importancia de leer las etiquetas de los envases; así como la importancia de las capacitaciones y la asistencia a un Centro de Salud cuando se presenten los síntomas característicos de la intoxicación por plaguicidas.

Limitaciones del estudio

Durante el desarrollo de este proyecto se identificaron diversas limitaciones entre éstas: el analfabetismo y la presencia de diferencias interculturales en la interpretación de las preguntas realizadas durante el cuestionario estructurado, el no contar con los datos del cuestionario estructurado en los dos periodos de tiempo en los que se realizó el muestreo, no contar con los valores basales de las actividades AChE y BuChE de cada uno de los participantes para estimar el porcentaje de alteración de estos biomarcadores, el no haber realizado recolección de la muestra de orina para la medición de dialquilfosfatos en toda la población de estudio para cada muestreo y no tener una muestra compuesta de orina con la recolección de los últimos siete días para la cuantificación de dialquilfosfatos.

7. CONCLUSIONES

- La alta frecuencia del grupo O Rh positivo permite sugerir que la población de estudio se encuentra conservada genéticamente, además de presentar una fuerte adherencia a sus tradiciones.
- La población de estudio se encuentra expuesta a POF del grupo Ia y Ib clasificados como altamente y extremadamente peligrosos.
- La población de estudio es aún más vulnerable a los efectos adversos de los plaguicidas debido en gran medida, a la falta de medidas personales de protección durante sus jornadas laborales, la alta tasa de analfabetismo y su cosmovisión.
- El 63% de la población presentó sobrepeso, este IMC elevado es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades degenerativas asociadas con muerte prematura y discapacidad en la edad adulta, enfermedades cardiovasculares, así como algunos tipos de cáncer, lo que representa un problema de salud pública.
- Las actividades de AChE y BuChE, así como diversas variables obtenidas del cuestionario, sugieren que el primer muestreo fue el periodo en el cual la población tuvo mayor exposición a plaguicidas.
- Los metabolitos más frecuentes en las muestras de orina fueron DMTP y DMP, los cuales corresponden con la información proporcionada respecto a los plaguicidas más utilizados por la población de estudio dentro de los que se encuentran dimetoato, azinfos metílico y paratión metílico.
- Los resultados sugieren un aumento en el perfil de metilación del gen *p15* por exposición a plaguicidas. Estos cambios pudieran afectar la expresión de este gen y afectar la regulación del ciclo celular.
- Aunque no se observó influencia de la exposición a plaguicidas en el patrón de metilación de los genes *p16* y *WRAP53*, es necesario realizar más estudios que permitan determinar las posibles implicaciones entre la exposición y el estilo de vida en la regulación de estos genes.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios *in vitro* e *in vivo* para tratar de elucidar los posibles mecanismos por los cuales los plaguicidas organofosforados pudieran alterar parámetros hematológicos en poblaciones ocupacionalmente expuestas.
- Evaluar con una batería de pruebas clínicas más amplia y un diagnóstico médico, el estado de salud de poblaciones huicholas para determinar las principales afecciones que presentan estas comunidades y sus posibles causas, ya que no se cuenta con registro hasta el momento de antecedentes clínicos en estas poblaciones.
- Monitorear los riesgos a la salud asociados con la exposición a plaguicidas en jornaleros huicholes, a través de biomarcadores de exposición, efecto y susceptibilidad genética, tomando en cuenta las características propias de la etnia.
- Evaluar los niveles de expresión de los genes evaluados para evidenciar las posibles implicaciones en la alteración del patrón de metilación de estos genes en poblaciones huicholes.
- Realizar estudios prospectivos en comunidades indígenas huicholas para determinar con mayor exactitud las principales variables que influyen sobre los cambios en los patrones de metilación en estas poblaciones.
- Profundizar en el conocimiento del epigenoma en poblaciones conservadas genéticamente y poblaciones mestizas.
- Continuar con la impartición de talleres sobre uso, manejo y efectos de los plaguicidas en poblaciones potencialmente expuestas, con la finalidad de reducir el riesgo de la exposición a éstos.
- Realizar un seguimiento de las poblaciones que asistieron a los talleres realizados en las comunidades huicholas para evaluar la influencia de la información brindada a estas comunidades y su relación con la exposición a plaguicidas.