



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**“Polimorfismos en el gen *PON1* y daño al DNA en
población expuesta ocupacionalmente a
plaguicidas organofosforados”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

DANIEL LOCIA MORALES

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Ma. ELENA MORENO GODÍNEZ

Chilpancingo, Gro. Junio de 2014





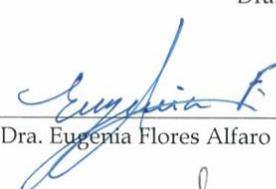
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 16 días del mes de octubre de dos mil trece, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Polimorfismos en el gen PON1 y daño al DNA en población expuesta ocupacionalmente a plaguicidas organofosforados", presentada por el alumno Daniel Locia Morales, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

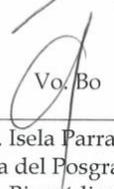

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez
Dirección de tesis


Dra. Eugenia Flores Alfaro

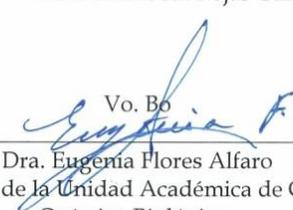

Dr. Gerardo Huerta Beristaín


Dr. Lorenzo Salgado Goytia


Dra. Aurora Elizabeth Rojas García


Vo. Bo

Dra. Isela Parra Rojas
Coordinadora del Posgrado en Ciencias
Biomédicas


Vo. Bo

Dra. Eugenia Flores Alfaro
Directora de la Unidad Académica de Ciencias
Químico Biológicas



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en Chilpancingo, Guerrero, y parte en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México D.F.

Bajo la dirección de la
Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

La asesoría de
Dra. Eugenia Flores Alfaro

Dr. Gerardo Huerta Beristáin

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

La asesoría externa de
Dra. Aurora Elizabeth Rojas García
Universidad Autónoma de Nayarit

Y el apoyo técnico de
QFB. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño
Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Durante el periodo en que el C. Daniel Locia Morales cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca de CONACyT. Además, recibió el apoyo del Banco Santander al otorgarle la beca de Movilidad Nacional Santander durante el periodo de Enero - Junio del 2013. Este trabajo recibió financiamiento por el proyecto "Daño al ADN y su relación con la exposición crónica a plaguicidas en agricultores del estado de Guerrero" otorgado por la UAGro a MEMG.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez, gracias por la oportunidad de haber formado parte de su grupo de trabajo y por la confianza depositada para la culminación de este proyecto.

Dra. Eugenia Flores Alfaro, Dr. Gerardo Huerta Beristaín, Dr. Lorenzo Salgado Goytia, Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, gracias por sus conocimientos, aportaciones y sugerencias para mejorar este trabajo.

QFB. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño, gracias por la asesoría técnica y por la oportunidad de aprender junto a su grupo de trabajo.

A mi tutora, **Dra. Mónica Espinoza Rojo**, gracias por su amistad, los consejos y las palabras de apoyo durante mi estancia en la maestría.

A todos los amigos del Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental: **Monse, Zuly, Lirio, Azu, Bere, Ury, Román, Angy, Alby, Rubén, Karla, Jaz, Brenda, Marco, Abdiel, Dra, Mayrut, MC. Claudia, Tere** gracias por hacer del laboratorio una estancia agradable y por todo el apoyo en esos días cuando: “se nos juntaban las muestras”, MUCHAS GRACIAS.

A la generación 2011-2013 de la MCB: **Alfredo, Anahí, Ana Lilia, Azucena, Carlos, Citlali, Fredy, Gabriel, Itzel, Karen, Lupita, Luis Ángel, Mireya, Romina y Xavier**. Gracias por esos dos años, por compartir su amistad y por soportar tanto seminario. GRACIAS!!!

DEDICATORIAS

A mi mamá: **Rosalinda Morales Silva**, por tu apoyo, por toda tu fuerza. Dedicado a la memoria de mi papá, **Alejandro Locia Espinoza**. Por la confianza en cada cosa que hago. Gracias a los dos por haberme enseñado a ser quien soy.

A mi hermano **Alejandro**, a **Lucy** y a **Julieta**.

A mi abuela **Julia**, mi abuela **Eusebia**.

A toda mi familia.

A mis amigos.

Más nos vale que esta vereda que andamos se convierta en camino, amigos, pues justo dimos el paso que nos aleja más del principio...

Adrián, Anahí, Citlali, Mario y Yazmín.
Gracias por haber compartido esta experiencia.

DANIEL LOCIA MORALES

Índice.

Abstract.....	1
Resumen.....	2
Introducción.....	3
Material y métodos.....	6
Resultados.....	10
Discusión y conclusiones.....	13
Referencias.....	26

Abstract.

Introduction. PON1 is an enzyme that hydrolyzes the active metabolites of OP (oxons). It has determined that single nucleotide polymorphisms (SNP) in the promoter (-108CT) and coding (L55M and Q192R) region of *PON1* gene induce variations in the concentration and hydrolytic activity of PON1. Allelic variants of PON1 SNP's may be factors of susceptibility to damage in DNA in population exposed to OP. **Objective.** The aim was to evaluate the association between the L55M and Q192R polymorphisms in *PON1* gene and induction of genotoxic damage in Guerrero state farmers exposed occupationally to OP. **Materials and Methods.** The population consisted of a group of 79 farmers and another group of 79 individuals without occupational exposure to OP. L55M and Q192R SNPs were identified by real-time PCR. Measurement of DNA damage was determined by the alkaline comet assay. The hydrolytic activity of PON1 (CMPAase activity) was determined by the rate of 4-chloromethylphenylacetate hydrolysis. The enzymatic activity of erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) was determined. The enzyme activities were determined by spectrophotometry.

Results. Genotype frequencies were: 55LL (85.4%) and 192QQ (19.6%). AChE and BuChE ($p < 0.001$) was found decreased in the farmer group. The CMPAase activity was similar in both groups ($p = 0.431$). No significant differences in DNA damage between the study groups were observed. In the farmers carriers of QQ genotype damage DNA was higher in comparison with the individual carriers of QQ genotype of the reference group. MQ haplotype carriers had a higher risk of DNA damage compared with individual carriers of the haplotype LR. The individuals with PON1 polymorphic variants may increase the risk of DNA damage in the population studied.

Keywords: Organophosphate pesticides, Paraoxonase 1, DNA damage, polymorphisms, L55M, Q192R.

Resumen.

Introducción. La PON1 es una enzima que hidroliza oxones, los metabolitos activos de los plaguicidas organofosforados (OP). Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en la región codificante (L55M y Q192R) del gen *PON1* inducen variaciones en la concentración y actividad hidrolítica de PON1. Portar las variantes alélicas de los SNP de *PON1* pueden ser factores de susceptibilidad frente al daño al ADN inducido por los OP. **Objetivo.** Evaluar la asociación entre los polimorfismos L55M y Q192R del gen de la PON1 y el daño genotóxico en agricultores del estado de Guerrero expuestos ocupacionalmente a OP. **Material y Métodos.** La población estuvo constituida por un grupo de 79 agricultores y 79 individuos sin exposición ocupacional a OP. Los SNP L55M y Q192R fueron identificados por PCR en tiempo real. La medición del daño al ADN se determinó con la técnica del ensayo cometa alcalino. Se determinó la actividad hidrolítica de la PON1 con el sustrato 4-(clorometil) fenil acetato (actividad CMPAasa). Se determinaron las actividades enzimáticas de acetilcolinesterasa eritrocitaria (AChE) y butirilcolinesterasa (BuChE). Las actividades enzimáticas fueron determinadas por espectrofotometría. **Resultados.** Las frecuencias genotípicas fueron las siguientes: 55LL (85.4%) y 192QR (42.4%). La AChE y BuChE ($p < 0.001$) se encontraron disminuidas en el grupo de agricultores, con respecto al grupo de referencia. La actividad CMPAasa fue similar en ambos grupos de estudio ($p=0.431$). Los agricultores portadores del genotipo QQ tuvieron un daño mayor al ADN con respecto al grupo de referencia. Los portadores del haplotipo MQ presentaron un mayor riesgo de daño al ADN comparado con los portadores del haplotipo LR. Presentar las variantes polimórficas de *PON1* puede incrementar el riesgo de daño al ADN en la población estudiada.

Palabras clave: Plaguicidas organofosforados, paraoxonasa 1, daño al ADN, polimorfismos, L55M, Q192R.

Introducción.

Los plaguicidas OP son triésteres del ácido fosfórico ampliamente utilizados en México, tienen un papel importante en la producción agrícola y la salud pública (Blanco-Muñoz *et al.* 2010). Los OP son activados metabólicamente por desulfuración oxidativa por acción de las enzimas hepáticas del citocromo P450 y forman compuestos oxonificados (oxones) (Costa *et al.* 2003). Los oxones son capaces de inhibir irreversiblemente la acetilcolinesterasa (AChE), produciendo efectos neurotóxicos provocados por la sobrestimulación de los receptores muscarínicos y nicotínicos (Koureas *et al.* 2011; Tarkowski *et al.* 2004). Si bien los mecanismos de toxicidad asociados a la exposición a OP son en su mayoría neurológicos, también se ha demostrado que son capaces de inducir alteraciones al ADN (Hreljac *et al.* 2008; Rahman *et al.* 2002; Simoniello *et al.* 2008), necrosis (Olgun *et al.* 2004), apoptosis (Kashyap *et al.* 2011), y estrés oxidativo (El-Demerdash, 2011; Kisby *et al.* 2009; McCauley *et al.* 2008; Muniz *et al.* 2008). El-Demerdash (2011) demostró que la exposición a plaguicidas OP induce estrés oxidativo por aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y disminución de las enzimas antioxidantes como la glutatión reducido, superóxido dismutasa, catalasa y glutatión S-transferasa.

La generación del estrés oxidativo puede provocar la oxidación de biomoléculas como el ADN (Kisby *et al.* 2009). De esta manera se sugiere que el estrés oxidativo puede ser un mecanismo por el cual los OP alteran el material genético (Ojha *et al.* 2011). Diversos estudios han reportado también que la exposición a OP modifica algunos parámetros hematológicos; Afshar *et al.* (2008) demostró experimentalmente que la exposición a fenitrotión (un OP) induce la disminución de algunos parámetros hematológicos como es el número en la cuenta de eritrocitos y el nivel de hemoglobina (Hb).

Por otro lado, la inducción del daño genotóxico inducido por los OP se ve modificado por la presencia de genotipos variantes que generan alteraciones en la capacidad metabólica de enzimas como la paraoxonasa 1 (PON1), la cual, participa

activamente en la detoxificación de los metabolitos de los OP (Cole *et al.* 2010; Costa *et al.* 2003). La PON1 (EC 3.1.8.1) es una lactonasa sérica con actividad esterasa sobre algunos inhibidores de la AChE, tiene un peso aproximado de 43 kDa y está compuesta de 354 aminoácidos. La PON1 es una esterasa polimórfica asociada a lipoproteínas de alta densidad (Otocka-Kmiecik y Orłowska-Majdak, 2009; Sirivarasai *et al.* 2007), es dependiente de calcio y de síntesis predominante en el hígado, de donde es distribuida hacia el plasma (por su unión a las lipoproteínas de alta densidad). La PON1 muestra una amplia especificidad de sustrato con diferentes tasas de hidrólisis y afinidad por los sustratos de compuestos OP (Jansen *et al.* 2009), de esta manera se sugiere que PON1 juega un papel importante en la detoxificación *in vivo* y por ende modula la toxicidad de estos compuestos (Costa *et al.* 2003; Goswami *et al.* 2009). PON1 es sintetizada por el gen *PON1* que pertenece a una familia de genes que incluyen a *PON2* y *PON3* (Goswami *et al.* 2009), el gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 7 (q21.22) y contiene 9 exones. El gen *PON1* es polimórfico (Davis *et al.* 2009). En la región promotora están presentes los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) -909 G>C, -126G>C -162>G, -832G>A y -108C>T, mientras que en la región codificante se localizan los polimorfismos L55M (163T>A, rs854560) y Q192R (575A>G, rs662) (Gupta, 2011). Así, los SNP presentes en la región codificante son capaces de modificar la capacidad de hidrólisis y las concentraciones de PON1 en el organismo (Goswami *et al.* 2009), aunque la actividad y la concentración de la enzima PON1 en sangre también pueden verse modificadas por factores ambientales (Fuhrman, 2012). El polimorfismo Q192R es responsable de las variaciones en la especificidad enzimática que afecta la capacidad hidrolítica de PON1 hacia ciertos sustratos de OP (Richter *et al.* 2009). Por otro lado, el SNP L55M está asociado con la variación en el nivel plasmático de PON1 (Furlong *et al.* 2010). Las frecuencias génicas de los alelos específicos del gen *PON1* varían según la etnia y son indicativos de la variación en la susceptibilidad frente a la exposición a plaguicidas entre los distintos grupos (Holland *et al.* 2006); en este sentido, Singh *et al.* (2011) demostró que en una población de agricultores hindúes expuestos a OP se presentó un mayor daño en el ADN en los agricultores portadores del genotipo 192QQ, por lo que estudiar las variantes génicas

de PON1 en diversas poblaciones nos permite identificar poblaciones susceptibles a la toxicidad de los OP.

En México, uno de los principales sustentos económicos es la agricultura, lo que conlleva inevitablemente al uso de plaguicidas, principalmente de tipo OP (Sánchez-Guerra *et al.* 2011). Sin embargo, existe poca información en poblaciones expuestas ocupacionalmente en las que se ha evaluado el riesgo de daño genotóxico y si este riesgo puede verse modulado por variantes polimórficas presentes en el gen *PON1*. El objetivo del estudio fue evaluar la asociación entre los polimorfismos L55M y Q192R del gen de la *PON1* y su relación con el daño genotóxico en agricultores mexicanos expuestos principalmente a OP, así también se determinaron algunos parámetros bioquímicos y hematológicos para conocer el efecto de la exposición a OP sobre éstos.

Material y métodos.

Población de estudio.

Se realizó un estudio transversal comparativo en trabajadores agrícolas expuestos ocupacionalmente a OP o a mezclas de estos, en las comunidades de los municipios de Chilpancingo de los Bravo, Mochitlán y Quechultenango (Figura 1). Se incluyeron 158 individuos divididos en dos grupos, un grupo de 79 agricultores, y 79 individuos no expuestos ocupacionalmente a OP, mayores de 18 años y que tuvieran al menos tres líneas generacionales de origen Guerrerense. Después de dar su autorización mediante la firma de un consentimiento informado, se aplicó a cada participante un cuestionario que incluyó una evaluación del historial de exposición a plaguicidas (tipo de plaguicidas, uso de protección y aspectos sobre el cultivo); también se incluyeron preguntas sobre datos sociodemográficos (edad, educación), consumo de tabaco y alcohol. Para fines de este estudio, se consideró que el individuo utilizó protección cuando usó al menos uno de los elementos de protección reglamentarios (guantes, cubrebocas, botas, lentes y ropa especial). Ninguno de los agricultores refirió utilizar protección completa durante el uso de plaguicidas. Un fumador activo fue considerado cuando refirió consumir al menos un cigarrillo por día, como fumador pasivo cuando reportó consumir al menos un cigarrillo por semana y no fumador cuando no refirió el consumo de tabaco. En el grupo de consumo de alcohol, se incluyó a los individuos con un consumo mayor a 20 g de alcohol (consumo de al menos 2 bebidas estándar, 660 ml, 26 g de alcohol) según datos establecidos por la OPS (2008).

Ensayo Cometa.

El ensayo cometa se realizó en condiciones alcalinas, de acuerdo al método modificado de Singh *et al.* (1988). Se mezclaron 20 μ L de sangre fresca en 1 mL de medio RPMI-1640 (Gibco, EUA), la suspensión se centrifugó a 3500 rpm durante 1 minuto para obtener el botón de células que fueron embebidas en 150 μ L de agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% (Sigma-Aldrich, EUA), con esta mezcla se montaron dos laminillas por individuo, colocando 75 μ L en un portaobjetos previamente cubierto con 150 μ L agarosa 0.5% de punto de fusión normal (Sigma-Aldrich, EUA).

Los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100mM, Tris 10 mM, DMSO 10% y Triton X100 1%) durante 1 hora. El desenrollamiento del ADN se llevó a cabo en una solución alcalina (NaOH 300mM, 1mM Na₂EDTA) por 20 min, antes de la electroforesis horizontal a 4°C, 25 V (0.73 V/cm) y 300 mA durante 20 min. La reacción alcalina se neutralizó con una solución de Tris (0.4 M, pH 7.4) y las laminillas se fijaron con etanol al 96%. Las laminillas se tiñeron con bromuro de etidio 20 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA) y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia (Olympus BX60) equipado con un excitador de 515-560 nm. Se analizaron un total de 100 células por individuo (50 células por laminilla) mediante el software COMET ASSAY IV (Perceptive Instruments, Eng). Los parámetros que se reportaron fueron los siguientes: momento de cola (Tail Moment, TM), longitud de la cola del cometa (Tail length, TL), adicionalmente se calcularon el momento de cola de Olive (Olive tail moment, OTM=(medial TL – Media de la longitud de la cabeza) X %ADN/100) y el porcentaje de ADN en la cola del cometa (%ADN=100-%ADN en la cabeza).

Identificación de los SNP's L55M y Q192R del gen *PON1*.

El ADN genómico fue extraído mediante la técnica rápida no enzimática modificada de Miller (1988). Los polimorfismos L55M (T>A, rs854560) y Q192R (A>G, rs662) se determinaron por PCR en tiempo real. Para el SNP L55M se utilizaron las sondas TaqMan (Applied Biosystems, EUA), (**VIC GCCAGTCCATTAGGCAGTATCTCCA y FAM GTCTTCAGAGCCAGTTTCTG**), la mezcla de reacción se realizó con 5 µl de la mezcla TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.375 µl de sonda 20X y 20 ng de ADN genómico en un volumen final de 10 µl. Para el polimorfismo Q192R se utilizaron las sondas TaqMan (Applied Biosystems, EUA) (**VIC CCTACTTACAATCCTG y FAM CCCTACTTACGATCCTG**). La mezcla de reacción se realizó con 4 µl de la mezcla TaqMan Universal PCR Master Mix, 0.2 µl de sonda 20X y 40 ng de ADN genómico en un volumen final de 8 µl. Las condiciones de ciclaje para la determinación de ambos SNP fueron: 1 ciclo de 50° C por 2 min y 95° C por 10 min para calentamiento, posteriormente 40 ciclos de 95° C por 15 s y 60° C por 1 min. Los polimorfismos L55M y Q192R se identificaron mediante PCR en tiempo real de

acuerdo al método establecido por Jansen *et al.* (2009) con el equipo ABI Prism 7500 Sequence Detection System de Applied Biosystems, EUA.

Determinación de acetilcolinesterasa eritrocitaria, butirilcolinesterasa y actividad CMPAasa.

La actividad de la AChE eritrocitaria se determinó por el método de Worek *et al.* (1999), como un biomarcador de exposición a OP. Brevemente, la actividad de la AChE fue medida por la coloración amarilla producida por la tiocolina al reaccionar con el ditiobisnitrobenzoato (DTNB) a una absorbancia de 436nm. Los niveles de AChE se corrigieron por los valores de Hb. Las lecturas se realizaron en el equipo NanoDrop2000c (Thermo Scientific).

La actividad de la butirilcolinesterasa sérica (BuChE) se determinó según las indicaciones del kit Butiriltiocolina Cinética (SPINREACT) como un biomarcador de exposición a OP. Brevemente, a partir de la hidrólisis de la butiriltiocolina por la BuChE presente en el plasma, se midió fotométricamente (405 nm) la velocidad de formación del 2-nitromercaptobenzoato, a partir de la reacción de la tiocolina y el 5.5'-ditiobis-2-nitrato. Las lecturas se realizaron en el equipo NanoDrop2000c (Thermo Scientific).

La actividad hidrolítica de PON1 se determinó según la técnica descrita por Richter *et al.* (2008) mediante el ensayo 4-clorometilfenilacetato (CMPA). Brevemente, la tasa de hidrólisis del CMPA fue determinada en el espectrofotómetro NanoDrop2000c (Thermo Scientific), las tasas de hidrólisis se midieron a 280nm durante 4 minutos a 25°C, utilizando el buffer con 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) y 1 mM de CaCl₂. La actividad PONasa se reportó como U/ml (coeficiente de extinción molar del CMPA $\epsilon=1.30$ mmol/L⁻¹cm⁻¹). Las actividades enzimáticas de PON1 se realizaron por duplicado. En cada inicio de las mediciones de la actividad enzimática, se introdujo como control interno una muestra sérica de valor conocido.

Determinación de parámetros bioquímicos y hematológicos.

En la población de estudio se determinaron los niveles de glucosa (GLU), colesterol (COL), triglicéridos (TGL), Hb y número de eritrocitos. Brevemente, la GLU, COL, TGL y Hb se determinaron espectrofotométricamente de acuerdo al protocolo establecido por los kits obtenidos de SPINREACT (USA).

Análisis estadístico.

Los datos se describieron en frecuencias, medias o medianas, desviación estándar y percentiles 25 y 75, los valores de p se obtuvieron mediante las pruebas estadísticas: t de Student, Mann-Whitney y Ji cuadrada según su distribución; se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo L55M y Q192R del gen *PON1*. Se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población. El desequilibrio de ligamiento y la inferencia de los haplotipos se determinó con el software en línea SHEsis. Para la evaluación de la asociación entre los polimorfismos del gen *PON1* y algunos factores de riesgo con el daño al ADN. Se categorizó el nivel de daño (momento de cola del cometa, TM) en terciles, se generaron los grupos: sin daño (0-0.76), daño medio (0.77-1.42) y daño severo (1.43-8.18), posteriormente se utilizaron modelos de regresión logística multinomial ajustados por edad, consumo de tabaco y alcohol. Las pruebas estadísticas se realizaron en el paquete estadístico STATA versión 12 y se consideró significativo el valor $p < 0.05$.

Resultados.

El presente trabajo tuvo como finalidad evaluar la asociación de los polimorfismos L55M y Q192R en el gen *PON1*, con el daño al ADN encontrado en una población agrícola expuesta principalmente a plaguicidas de tipo organofosforado. La población estudiada fue de 159 individuos de sexo masculino, de los cuales 79 corresponden a individuos expuestos laboralmente a mezclas de plaguicidas (Agricultores) y 79 individuos sin exposición laboral a mezclas de plaguicidas (No expuestos).

Las características sociodemográficas de los grupos de estudio están resumidas en la tabla 1. La media de edad fue de 49 ± 12 años en el grupo de agricultores y de 37 ± 11 años para el grupo de no expuestos, siendo los agricultores el grupo de mayor edad ($p < 0.001$). En relación al IMC y al consumo de tabaco no se observan diferencias significativas entre los grupos de estudio. El grupo de agricultores presentó ligeramente un mayor consumo de alcohol (59% vs 44%, $p=0.056$).

Los agricultores tuvieron un tiempo de exposición laboral a plaguicidas de 15 años (6-20), el 68% ($n=50$) refirió mezclar plaguicidas, el 99% ($n=78$) realiza su actividad laboral en campo abierto, y el 42% ($n=33$) de la población agrícola refirió no utilizar ningún tipo de protección cuando aplica los plaguicidas.

La tabla 2 relaciona los valores de las actividades enzimáticas determinadas, perfil bioquímico y hemático con los grupos de estudio. Se observó una tendencia hacia la disminución en la actividad AChE en el grupo de agricultores, la actividad BuChE se encontró disminuida en el grupo de agricultores en comparación con el grupo de no expuestos ($p < 0.001$). Se encontró un valor medio de hemoglobina disminuido significativamente en los agricultores ($p < 0.001$) en comparación con en el grupo de no expuestos (15.5 g/dL vs 16.3 g/dL), el número de eritrocitos estuvo disminuido en los agricultores con respecto al grupo de no expuestos ($p < 0.001$).

Las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos L55M y Q192R no mostraron tener una distribución significativamente diferente entre los dos grupos estudiados. Los genotipos 55LL (85.4%) y 192QR (42.4%) fueron los más comunes

en la población de estudio; mientras que el genotipo 55MM solo se presentó en el (0.06%) de la población. Los alelos más frecuentes fueron 55L (0.92) y 192R (0.59) (Tabla 3). Las frecuencias genotípicas de los tres polimorfismos analizados se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$, datos no mostrados). Se evaluó el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos analizados, estos presentaron un valor de $D' = 0.563$.

En la tabla 4 se muestran el efecto de los polimorfismos L55M y Q192R sobre las actividades enzimáticas CMPAasa, AChE y BuChE. La actividad de AChE fue mayor en los agricultores portadores del genotipo LL ($p = 0.05$). En el grupo de no expuestos la actividad CMPAasa fue mayor en los portadores del genotipo RR ($p = 0.01$). En el grupo de agricultores no se encontró diferencia significativa en la distribución de la actividad de AChE cuando esta se comparó entre los portadores del genotipo Q192R. La actividad de BuChE fue menor en los agricultores portadores de los genotipos 192QR y 192RR ($p < 0.05$ y $p < 0.001$) en comparación con las actividades BuChE del grupo de no expuestos.

Con respecto al nivel de daño al ADN, no se encontró diferencia significativa entre ambas poblaciones. Sin embargo, aunque los grupos no muestran diferencia significativa, el Tail Moment de los agricultores es ligeramente mayor al de los individuos no expuestos (tabla 5). En la figura 2 se muestra la relación entre el daño al ADN (TM) y la distribución de los genotipos en la población de estudio. Los agricultores portadores del genotipo 55LM tienen un índice de daño mayor, aunque no fue significativo ($p = 0.23$). Así también, los agricultores portadores del genotipo 192QQ muestran un mayor daño al DNA en comparación con los individuos del grupo no expuesto del genotipo 192QQ ($p = 0.03$).

En la tabla 6 se muestran los resultados del modelo estadístico para evaluar el efecto de los polimorfismos L55M, Q192R y su asociación con el daño al ADN. El modelo se ajustó con la edad, el consumo de tabaco y alcohol. De acuerdo al modelo desarrollado, los portadores del genotipo QQ mostraron una tendencia mayor para la

inducción de daño al ADN por exposición a OP (OR=8.02, IC=95% 0.7-94.7, $p=0.09$). La asociación entre los haplotipos para los SNP L55M y Q192R en el gen *PON1* y el daño al ADN se muestra en la (Tabla 7). De un total de 4 combinaciones distintas (LR, LQ, MR y MQ), el 33% de los agricultores es portador del haplotipo LR, mientras que solo el 3% de los portadores en el mismo grupo presentaron el haplotipo MQ. No se observaron diferencias significativas al comparar las frecuencias de los haplotipos entre los grupos de estudio.

Discusión y conclusiones.

El uso de plaguicidas se ha incrementado exponencialmente en las últimas décadas en respuesta a las necesidades alimenticias de la población. Los plaguicidas se usan en una gran variedad de combinaciones, hecho que puede incrementar los efectos tóxicos de los mismos (Sánchez-Guerra *et al.* 2011). Actualmente se realizan investigaciones en todo el mundo encaminadas a la evaluación de tales efectos con el objetivo de evaluar el riesgo de la exposición ocupacional a los plaguicidas. En México son pocos los reportes que evalúan el uso y los efectos de los plaguicidas en la salud de los agricultores (López-Flores *et al.* 2009); Las malas condiciones de trabajo y el desconocimiento de los riesgos potenciales por exposición a plaguicidas, incrementa el riesgo de exposición crónica en estos individuos.

En el presente estudio se evaluó el daño al ADN como resultado de la exposición crónica laboral a plaguicidas OP y su relación con los SNP de *PON1* como factores de susceptibilidad. En este trabajo no se encontró diferencia significativa entre el daño al DNA encontrado en los agricultores y el grupo no expuesto ocupacionalmente; sin embargo, cuando el daño al DNA se analizó por genotipo, encontramos que los agricultores portadores del genotipo QQ muestran índices de daño mayor ($p=0.03$) en comparación con los agricultores portadores del genotipo QQ del grupo de los no expuestos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Singh *et al.* (2011) para el polimorfismo Q192R en el que los portadores del genotipo QQ muestran índices de daño mayor en una población de agricultores de origen Hindú, sugiriendo que los portadores de esta variante polimórfica podrían tener disminuida la capacidad hidrolítica de *PON1*.

Por otro lado, aunque el mecanismo principal de daño agudo inducido por los OP ocurre por la inhibición de la AChE (Costa *et al.* 2003), en este trabajo se determinaron las actividades AChE y BuChE. Aunque la actividad AChE no mostró diferencias significativas cuando se comparó entre los grupos de estudio esta se encontró disminuida en el grupo de agricultores, esta disminución en la actividad de AChE se debe a la inhibición de esta por los oxones activos de los OP; al fosforilar el

sitio activo rico en serinas de la AChE, llevando esto a la pérdida de la función hidrolítica sobre el neurotransmisor acetilcolina. Lo que ocasiona los efectos nocivos asociados a la neurotoxicidad de estos compuestos por sobreestimulación colinérgica (Tarkowski *et al.* 2004). La actividad BuChE se encontró disminuida en el grupo de agricultores ($p < 0.001$), la inhibición de la actividad BuChE puede deberse a que los metabolitos de los OP también pueden unirse covalentemente a los sitios activos de la BuChE inhibiendo también su actividad enzimática (Worek *et al.* 2005). Jintana *et al.* (2009) reportó una disminución en la actividad BuChE en una población expuesta a OP y sugirió que esta disminución puede estar influenciada por la duración de la exposición a OP y principalmente por el uso de protección y medidas preventivas para evitar esta exposición; en este trabajo el 42% ($n=33$) del grupo de agricultores reportó no haber utilizado protección cuando aplicaba los plaguicidas sobre los cultivos, por lo que la disminución de la actividad BuChE en la población puede estar influenciada por este factor, debido al incremento en la exposición a OP. Varios reportes han mostrado la disminución de estas dos colinesterasas en trabajadores agrícolas (Cataño *et al.* 2008; Hernández *et al.* 2005). Debido a que se ha reportado que los compuestos OP muestran inhibición preferencial hacia AChE y BuChE (Kamanyire y Karalliedde, 2004), para el monitoreo de poblaciones expuestas a OP debe realizarse el análisis conjunto de las actividades de AChE y BuChE.

Con respecto a la relación feno-genotipo de PON1 se determinaron las frecuencias alélicas de los SNP L55M y Q192R, estas fueron similares a las reportadas en población mexicana por Rojas-García *et al.* (2005), Gamboa *et al.* (2006), López-Flores *et al.* (2009) y Pérez-Herrera *et al.* (2008). Dado que las poblaciones muestran diferencias en la distribución de los polimorfismos presentes en las regiones promotora y codificante del gen *PON1*, tales polimorfismos son capaces de modificar la actividad y concentración de la PON1 (Brophy *et al.* 2001; Holland *et al.* 2006), y por tanto modular el efecto de los OP.

Este estudio mostró los cambios entre los valores de las actividades enzimáticas de AChE y BuChE, solo BuChE fue diferente significativamente según la distribución de

los genotipos de PON1, los individuos portadores del genotipo RR mostraron una actividad BuChE mayor en el grupo de no expuestos ($p < 0.001$). No hubo diferencia significativa en la distribución de los genotipos L55M, sin embargo, los portadores de genotipo 55LL mostraron mayores actividades AChE y BuChE. Lo anterior puede deberse a que según estudios realizados *in vitro*, los portadores de los alelos silvestres de PON1 (L y R) detoxifican con mayor rapidez los oxones de los OP (Goswami *et al.* 2009) y esto puede reducir la inhibición de las colinesterasas AChE y BuChE.

Se ha mostrado que existe variación en las actividades de PON1 entre los diferentes grupos poblacionales (Gamlin *et al.* 2007; Phuntuwate *et al.* 2005) por tanto estas variaciones pueden ser capaces de modificar la toxicidad de los OP. Así, en este estudio se determinó la actividad hidrolítica de PON1 (actividad CMPAasa) con la finalidad de identificar la susceptibilidad de los individuos expuestos a los OP. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio cuando se realizó la comparación de la actividad CMPAasa en la población en general, sin embargo cuando la población se estratificó por genotipo los portadores de los genotipos LL y RR mostraron la actividad CMPAasa incrementada (sin que esta fuera significativa), como lo reportó Ellison *et al.* (2012). Estas variaciones en la actividad hidrolítica de PON1 pueden deberse al efecto que ejercen los polimorfismos sobre la capacidad hidrolítica y el nivel de PON1 en sangre, respectivamente (Costa *et al.* 2003). El SNP L55M afecta el nivel PON1 en plasma, sugiriendo que el genotipo LL produce más PON1 (Leviey y James, 2000; Furlong *et al.* 2006; Sirivarasai *et al.* 2007). Por otro lado, el SNP Q192R tiene un efecto directo en la capacidad hidrolítica de PON1, modifica la capacidad de la enzima de manera sustrato-dependiente al modificar la estructura del sitio catalítico, así, los portadores del genotipo RR tienen una forma de PON1 que es más eficiente para hidrolizar paraoxones (Costa *et al.* 2003). Como se mencionó anteriormente, la actividad hidrolítica de PON1 se determinó mediante el uso del sustrato CMPA con el objetivo de disminuir el riesgo de contaminación cuando se manipulan sustratos como el paraoxón, Richter *et al.* (2009) demostró la

eficiencia en el uso de análogos estructurales (menos tóxicos) del paraoxón, como es el sustrato CMPA, para la determinación de la actividad hidrolítica de PON1.

Por el contrario, aunque se ha reportado que los polimorfismos modifican la actividad hidrolítica de la enzima (Holland *et al.* 2006), existen otros factores que también son capaces de modificar el estatus de la PON1, algunos factores importantes incluyen los hábitos alimenticios, consumo de alcohol (Deakin *et al.* 2003; Marsillach *et al.* 2007), el consumo de tabaco y la edad (Goswami *et al.* 2009; Marsillach *et al.* 2007). Por otro lado el consumo de fibras solubles, β -caroteno y diversos flavonoides se ha asociado con el incremento de la expresión de PON1 (Precourt *et al.* 2009); por lo que, aunque estas variables no fueron consideradas en este estudio sería importante evaluar su papel en la modulación de PON1 frente a la exposición a OP.

Los resultados de este trabajo no mostraron una distribución con diferencias significativas entre los genotipos en el gen *PON1* y los índices de daño en el ADN entre los grupos de estudio (tabla 5), sin embargo, los agricultores portadores del QQ muestran índices de daño mayor ($p=0.03$), esto concuerda con lo reportado por Singh *et al.* (2011) para el polimorfismo Q192R en el que los portadores del genotipo 192QQ muestran índices de daño mayor. Este sentido, en una revisión hecha por Bolognesi, (2003) mostró que la exposición crónica a compuestos OP tiene un potencial genotóxico alto y esta podría estar asociada a procesos de carcinogénesis y efectos nocivos sobre la reproducción, de esta manera los OP se han considerado como potenciales mutágenos, aunque es necesario realizar mas estudios que nos permitan confirmar estos hallazgos. En un estudio realizado por Rojas-García *et al.* (2009), encontraron que la exposición a paraoxón en linfocitos es capaz de inducir el incremento en el número de micronúcleos y este incremento depende del genotipo de PON1 encontrado. De la misma manera Sunkaria *et al.* (2013) demostraron que el diclorvos (un OP) es un inductor de estrés oxidativo en el sistema nervioso central, y que la exposición a diclorvos induce el incremento de la ataxia-telangiectasa mutada, un sensor de daño al ADN; así múltiples estudios han reportado que el daño al ADN es inducido por estrés oxidativo en respuesta a la exposición a plaguicidas, con lo que se podría explicar el incremento en la aparición de padecimientos que incluyen a

diversos tipos de cáncer (Vakonaki *et al.* 2013), enfermedad de Parkinson y algunos desórdenes neurológicos (Muniz *et al.* 2008).

Por lo anterior, se ha propuesto que el incremento de las especies reactivas de oxígeno y la disminución de las defensas antioxidantes del organismo es una condición que se ha asociado a la exposición crónica a plaguicidas OP (Kisby *et al.* 2009; Soltaninejad y Abdollahi, 2009); el incremento de las especies reactivas de oxígeno induce la oxidación de purinas y pirimidinas y la inducción de rupturas (de una sola cadena y de cadena doble) en las hebras del ADN (Kryston *et al.* 2011). Esto ha sido demostrado en células HepG2 expuestas a malatión, un plaguicida OP (Moore *et al.* 2010). Los plaguicidas OP son conocidos por inducir estrés oxidativo mediante la inhibición enzimática de enzimas antioxidantes como la glutatión reducido (GSH) (Soltaninejad y Abdollahi, 2009); por ejemplo, el agotamiento de GSH celular (glutatión reducido), por debajo de un nivel crítico normal impide la conjugación de xenobióticos a GSH y les permite combinar libremente de forma covalente con el ADN, ARN, y proteínas celulares, dando como resultado alteraciones celulares (Ojha *et al.* 2011). Por lo que varios plaguicidas han sido probados en una amplia variedad de ensayos mutagénicos y se ha demostrado que son capaces de inducir alteraciones en el ADN y aberraciones cromosómicas en estudios *in vitro* e *in vivo* en animales (revisado en: Bolognesi, 2003).

Por otro lado, uno de los factores de susceptibilidad que pueden modular las respuesta a los OP son las enzimas encargadas del metabolismo de los OP ya que juegan un papel importante en la modificación de los daños inducidos por la exposición a OP; en este sentido PON1 juega un papel importante en la detoxificación de los OP. PON1 participa activamente en la hidrólisis de los oxones formados durante la bioactivación por procesos de desulfuración oxidativa catalizados por el grupo de enzimas del citocromo P450 y por tanto en la eliminación de estos compuestos del organismo. Los polimorfismos de PON1 son responsables, en parte, de la variación de la actividad catalítica y la expresión de la enzima y se han asociado con la susceptibilidad a este tipo de compuestos (Holland *et al.* 2006) como lo demostró Rojas-García *et al.* (2009), al reportar que el incremento en el

número de micronúcleos está asociado con las variaciones inducidas por el polimorfismo Q192R sobre la actividad enzimática de PON1, de esta manera los portadores del genotipo QQ (con menor actividad paraoxonasa) tuvieron mayores índices de daño. Los resultados mostraron que el daño al ADN fue mayor en los individuos agricultores portadores del genotipo QQ comparado con los que portaban el genotipo RR (Figura 2b); sin embargo en los modelos de asociación se observan tendencias de incremento de daño en los individuos portadores del genotipo 192QQ cuando el modelo se ajustó por la edad, el consumo de tabaco y alcohol, es decir, en los portadores de este genotipo los índices de daño podrían incrementarse cuando hay exposición a OP debido a que, este genotipo genera una proteína con una tasa de hidrólisis menor (Costa *et al.* 2003).

Recientemente se he reportado que la exposición crónica a OP se ha asociado a modificaciones en diversas rutas metabólicas dentro de las que se incluyen, el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, adicionalmente también se han reportado que la exposición a OP puede tener efecto sobre vías involucradas en la secreción hormonal (adrenal, gonadal) (Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2011); fue por eso que en este trabajo se evaluaron algunos otros parámetros como los niveles de GLU, COL, TGL, Hb y número de eritrocitos. Aunque no encontramos diferencias significativas entre los niveles de GLU, COL y TGL, sería interesante determinar cuál es el efecto de los OP sobre rutas metabólicas específicas que podrían alterar el metabolismo de los individuos expuestos a OP. También se encontró que la Hb y número de eritrocitos estaba disminuido en los agricultores ($p < 0.001$). Aunque el efecto de los OP sobre estas parámetros hematológicos ha recibido poca atención, Rojas-García *et al.* (2011) reportó datos similares a los de este estudio. También, Elsharkawy *et al.* (2013) reportó que en ratas expuestas experimentalmente a clorpirifos, un OP una disminución en diversos parámetros hematológicos entre los que se encuentran la Hb y el conteo de eritrocitos sugiriendo que estos cambios se debe a que los residuos de los metabolitos de los plaguicidas son capaces de interaccionar en la biosíntesis de la hemoglobina y en el acortamiento de la vida útil de los eritrocitos circulantes, por lo que sería importante determinar cuál es el efecto

directo de los OP sobre estas rutas metabólicas, y de esta manera incrementar la evidencia de que la exposición laboral crónica a OP es capaz de inducir alteraciones que modifican la homeóstasis del organismo generando padecimientos y enfermedades asociadas a esta exposición.

Para conocer el efecto conjunto de los polimorfismos analizados se llevó a cabo un análisis de haplotipos, encontrando que los portadores del haplotipo MQ (OR=3.38 IC 95% 0.53-21.41, $p=0.17$), muestra una tendencia hacia la disminución de la actividad hidrolítica y la concentración de PON1 en plasma, por lo que estos resultados sugieren que los individuos portadores de este haplotipo pueden tener un riesgo mayor de daño al DNA comparado con los portadores del haplotipo LR, los cuales presentan en su combinación de alelos la isoforma de PON1 con mayor actividad hidrolítica (Rojas-García *et al.* 2005). Debido a que el haplotipo MQ solo se encuentra en el 3% del grupo de agricultores, sería importante determinar la distribución de los haplotipos en una población mayor, debido a que el alelo M tiene una frecuencia baja (0.08). en la población analizada en este trabajo.

Otros SNP también pueden desempeñar un papel importante en la inducción del daño al ADN. Por ejemplo, Wong *et al.* (2008) sugirió que las variantes polimórficas de diferentes genes (*GSTM1*, *GSTT1*, *CYP3A5*, *XRCC1*) que participan activamente en el metabolismo completo de los OP pueden ser factores que modifiquen la exposición e incrementen el riesgo de daño en el ADN tras la exposición a los plaguicidas. Por tanto, los efectos de los plaguicidas no están asociados a las variaciones otorgadas por un solo genotipo, una evaluación que incluya una mayor cantidad de polimorfismos podría sugerir cuales de estos podrían funcionar como factores predictivos para determinar que poblaciones son más susceptibles al efecto nocivo de los OP. El hecho de no encontrar diferencias en el daño inducido por la exposición a OP puede deberse a que no todos los agricultores estuvieron expuestos a las mismas dosis durante el curso de su trabajo, de esta manera podrían considerarse exposiciones cortas aún a pesar del tiempo de exposición. Así podemos concluir que en la población de estudio, aunque la actividad de PON1 no mostró relación con el daño al ADN, los polimorfismos L55M y Q192R de PON1 se

encontraron asociados con el daño al ADN, sugiriendo un papel importante en la detoxificación de los OP. Por otro lado, la disminución de la Hb y la cuenta eritrocitaria encontrada sugiere que estos pueden ser blancos importantes de toxicidad de los OP, aunque es necesario realizar más estudios que expliquen de manera adecuada este efecto.

Tablas y figuras.

Tabla 1. Características generales de la población de estudio.

	Agricultores n=79	No expuestos n=79	<i>p</i> [*]
Edad (años)	49 ± 12	37 ± 11	<0.001^a
IMC (Kg/m²)	26.4 (24.3 - 30.9)	26.5 (24.7 - 30.3)	0.947 ^b
Años de escolaridad	6 ± 3	9 ± 4	<0.001^a
Consumo de tabaco			
Fumador activo	78.5% (62)	70.9% (56)	0.461 ^c
Fumador pasivo	11.4% (9)	12.7% (10)	
No fumador	10.1% (8)	16.4 % (13)	
Consumo de alcohol			
Si	59% (47)	44% (35)	0.056 ^c
No	41% (32)	56% (44)	
Exposición a plaguicidas (años)	15(6-20)	N/A	-
Uso de protección			
Si	57% (45)	N/A	
No	42% (33)		
A veces	1% (1)		
Uso de mezclas			
Si	68% (50)	N/A	-
No	32% (24)		
Área de trabajo			
Campo abierto	99% (78)	N/A	-
Invernadero	1% (1)		

Valores cualitativos expresados en frecuencias, valores cuantitativos expresados en $\bar{X} \pm DE$ y mediana (percentiles 25 y 75). *Valores de *p* (< 0.05) obtenidos mediante ^a t de Student. ^b Mann-Whitney. ^c X². N/A, No Aplica.

Tabla 2. Relación entre las actividades enzimáticas, el perfil bioquímico y hemático con los grupos de estudio

	Agricultores n=79	No expuestos n=79	p*
*Actividad CMPAasa (U/mL)	22.2±5.4	22.8±5.2	0.431 ^a
**AChE (U/g Hb)	45.9 (36.3-63.5)	47.5(37.7-66.4)	0.51 ^b
***BuChE (U/L)	5314.5±1297.2	6162.6±1289.3	<0.001 ^a
¹ Glucosa (mg/dL)			
<100	84 (77-93)	85 (77-99)	0.66 ^b
101-125	82.3%(65)	77.2%(61)	
≥126	7.6%(6)	6.3%(5)	0.49 ^c
	10.1%(8)	16.5%(13)	
² Colesterol (mg/dL)	155 (129-177)	158 (140-186)	0.19 ^b
<200	87.3%(69)	89.9%(71)	
200-239	11.4%(9)	8.9%(7)	0.87 ^c
≥240	1.3%(1)	1.2%(1)	
² Triglicéridos (mg/dL)	157 (104-223)	178 (115-230)	0.12 ^b
<150	46.8%(37)	39.2%(31)	
150-199	20.2%(16)	19%(15)	0.44 ^c
200-499	31.6%(25)	36.7%(29)	
≥500	1.3%(1)	5.1%(4)	
³ Hemoglobina (g/dL)	15.5 (14.4-16.3)	16.3 (15.6-17.3)	<0.001 ^b
Sin anemia	92.4% (73)	100% (79)	
Anemia media	6.3% (6)	-	0.044 ^c
Anemia Moderada	1.3% (1)	-	
Eritrocitos (10 ⁶ /m ³)	5.01 (4.62-5.28)	5.26 (5.03-5.50)	<0.001 ^b

Valores cualitativos expresados en frecuencias, valores cuantitativos expresados en $\bar{X} \pm DE$ y mediana (percentiles 25 y 75). ^aValores de p (< 0.05) obtenidos mediante t de Student. ^b Mann-Whitney. ^c X². *Actividad hidrolítica de PON1 (CMPAasa), **Actividad Acetilcolinesterasa (AChE) ajustada por el nivel de Hb, ***Actividad Butirilcolinesterasa (BuChE). ¹Clasificación del nivel de glucosa sérica en ayuno obtenidos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA) 2013: Normal (<100 mg/dL), Prediabetes (101-125 mg/dL), Diabetes (≥126 mg/dL). ²Clasificación de los valores de colesterol y triglicéridos obtenidos de la ATPIII. Colesterol: Normal (<200 mg/dL), Límite alto (200-239 mg/dL) y Alto (≥ 240 mg/dL). Triglicéridos: Normal(<150 mg/dL), Límite alto (150-199 mg/dL), Alto (200-249 mg/dL), Muy alto (≥500 mg/dL). ³ Valores de hemoglobina obtenidos de la OMS: sin anemia (≥13 mg/dL)

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos -108CT, L55M y Q192R de PON1.

Polimorfismo	Población general n(%)	n	Agricultores (%)	n	No expuestos (%)	p*
L55M						
LL	135 (85.4%)	64	81%	71	89.9%	
LM	22 (14%)	15	19%	7	8.9%	0.11
MM	1 (0.6%)		--	1	1.2%	
Alelos						
L	292 (0.92)		0.91		0.94	0.92
M	1 (0.08)		0.09		0.06	
Q192R						
QQ	31 (19.6%)	15	18.5%	16	20%	
QR	67 (42.4%)	34	43%	33	42%	0.97
RR	60 (38%)	30	38.5%	30	38%	
Alelos						
Q	129 (0.41)		0.40		0.41	0.12
R	187 (0.59)		0.60		0.59	

Los genotipos analizados en la población se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (p >0.05).

Tabla 4. Efecto de los genotipos de PON1 sobre el nivel de algunos biomarcadores en la población de estudio.

Genotipo	Agricultores				No expuestos			
	n	CMPAasa ¹	AChE ²	BuChE ³	n	CMPAasa ¹	AChE ²	BuChE ³
L55M								
LL	64	22.1 ± 5.4	52.3(37.9-66.1)	5374.8±1334.5	71	23.1 ± 5	46(37.3-61.9)	6153.8±1149.6
LM	15	22.2±5.6	38.7(32.3-62.9)	5057.4±1129.1	7	20.4±5.9	57.8(31.9-74.3)	6240.3±2301.9
MM	0	-	-	-	1	12.6	17..6	3640.44
		<i>p</i> =0.97	<i>p</i>=0.05	<i>p</i> =0.39		<i>p</i> =0.16	<i>p</i> =0.24	<i>p</i> =0.85
Q192R								
QQ	15	22.4±5.9	52.2(30.7-67.1)	5026.3±745.9	16	20.3±4.8	42.9(31.1-48.7)	5976.8±1227
QR	34	21.4±5.9	48.1(34.9-68.4)	5218.4±999.1ξ*	33	22.3±5.5	53.6(39.5-67.1)	6249.4±1550ξ*
RR	30	23±4.5	45.1(37.3-58.1)	5567.6±1732.5ξ**	30	24.7±4.5	44.4(37.7-58.2)	6166.2±1006.4ξ**
		<i>p</i> =0.49	<i>p</i> =0.66	<i>p</i> =0.36		<i>p</i>=0.01	<i>p</i> =0.17	<i>p</i> =0.79

Valores cuantitativos expresados en $\bar{X} \pm DE$ y mediana (percentiles 25 y 75). ¹Actividad paraoxonasa (CMPAa) U/mL. ²Actividad acetilcolinesterasa ajustada por Hb (AChE) U/g Hb. ³Actividad butirilcolinesterasa (BuChE) U/mL.

ξ Los valores estratificados por genotipo se compararon entre los grupos de estudio.

* Valor de *p* < 0.05

** Valor de *p* < 0.001

Tabla 5. Parámetros del ensayo cometa evaluados en los grupos de estudio.

Grupo	*TL	*%ADN	*TM	*OTM
Agricultores	21.1 (18.4-25.5)	8.2 (6.4-12.4)	1 (0.7-1.7)	0.2 (-0.1-0.9)
No expuestos	21.1 (17.5-26.8)	7.7 (5.5-10.4)	0.9 (0.6-1.6)	0.2 (-0.1-0.6)
¹ p	0.71	0.43	0.64	0.66

Valores expresados en mediana (percentiles 25 y 75). Valores de p (< 0.05) obtenidos mediante Kruskal-Wallis. *TL (longitud de la cola), %ADN (porcentaje de ADN en la cola), TM (momento de cola de cometa), OTM (momento de cola de olive).

Tabla 6. Efecto de los polimorfismos sobre el daño al ADN en el grupo de agricultores¹.

SNP	Modelo crudo				Modelo ajustado			
	Daño medio OR [95% IC]	p	Daño Severo OR [95% IC]	p	Daño medio OR [95% IC]	p	Daño Severo OR [95% IC]	p
L55M	1	---	1	---	1	---	1	---
LL	0.2 (0.2-2.4)	0.2	2.5 (0.6-11.1)	0.2	0.1 (0.01-1.6)	0.1	2.65 (0.5-12.8)	0.22
LM								
Q192R								
RR	1	---	1	---	1	---	1	---
QR	0.4 (0.1-1.5)	0.2	1.1 (0.3-4.7)	0.9	0.3 (0.1-1.5)	0.15	1.1 (0.2-4.6)	0.9
QQ	3.1 (0.334-7)	0.4	8.9 (0.8-100.1)	0.07	4.4 (0.4-53.7)	0.25	8.2 (0.7-94.7)	0.09

¹Modelo de regresión logística multinomial; Daño al ADN categorizado en: Sin daño (0-0.76), Daño medio (0.77-1.42) y daño severo (1.43-8.18). Para la comparación entre las categorías de daño al ADN se utilizó al grupo Sin daño como grupo de comparación ²Modelo ajustado edad, consumo de tabaco y consumo de alcohol.

Tabla 7. Asociación de los haplotipos de los polimorfismos L55M y Q192R del gen *PON1* y el daño al ADN (TM) en la población de estudio.

Haplotipos	Agricultores %(n)	No expuestos %(n)	Modelo crudo	
			OR [95% IC]	p
1 L R*	33 (26)	36 (28)	1.00	---
2 L Q	58 (46)	58 (46)	0.9 (0.6 - 1.6)	0.96
3 M R	6 (4)	5 (4)	1.1 (0.9 - 2.8)	0.88
4 M Q	3 (2)	1 (1)	3.4 (0.5 - 21.4)	0.17

*Categoría de referencia.

Figura 1.

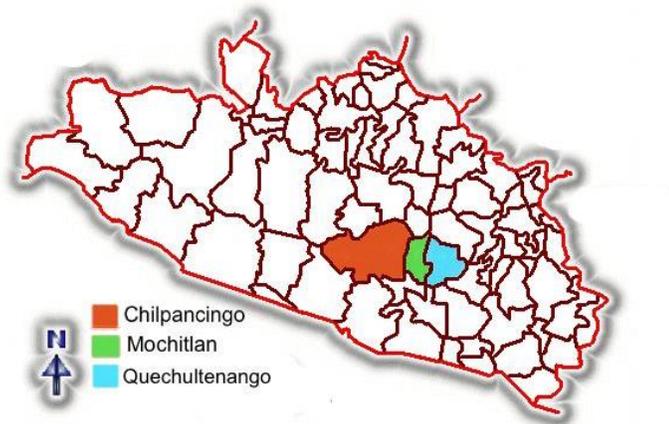


Figura 1. Mapa de la localización de los municipios de origen de los individuos participantes en el estudio.

Figura 2.

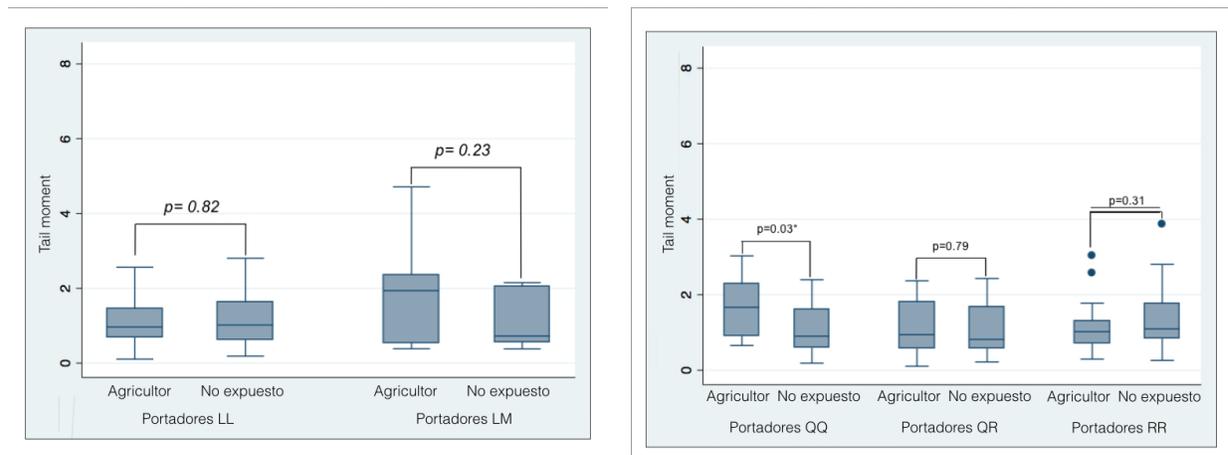


Figura 2. Comparación del efecto de los polimorfismos sobre el daño al ADN. a) Efecto del polimorfismo L55M sobre el daño al ADN, b) Efecto del polimorfismo Q192R sobre el daño al ADN. Tail moment (momento de cola)

Referencias.

- 1.- **ADA**, A. D. A. (2013) Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. DIABETES CARE.
- 2.- **Ahmad**, I., Narang, R., Venkatraman, A., Das, N., 2011. Frequency distribution of the single-nucleotide -108C/T polymorphism at the promoter region of the PON1 gene in Asian Indians and its relationship with coronary artery disease. *J. Community Genet.* 2, 27–32.
- 3.- **Afshar**, S., Heidari, R., Farshid, A.A., Ilkhanipour, M., 2008. Effect of oral administration of fenitrothion on biochemical and hematological parameters in rats. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* 11, 1742–1745.
- 4.- **Blanco-Muñoz**, J., Morales, M.M., Lacasaña, M., Aguilar-Garduño, C., Bassol, S., Cebrián, M.E., 2010. Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 25, 1787–1795.
- 5.- **Bolognesi**, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 543, 251–272.
- 6.- **Brophy**, V.H., Jampsa, R.L., Clendenning, J.B., McKinstry, L.A., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2001. Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1428–1436.
- 7.- **Cataño**, H.C., Carranza, E., Huamaní, C., Hernández, A.F., 2008. Plasma cholinesterase levels and health symptoms in peruvian farm workers exposed to organophosphate pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 153–159.
- 8.- **Chen**, J., Kumar, M., Chan, W., Berkowitz, G., Wetmur, J.G., 2003. Increased influence of genetic variation on PON1 activity in neonates. *Environ. Health Perspect.* 111, 1403–1409.
- 9.- **Cole**, T.B., Jansen, K., Park, S., Li, W.-F., Furlong, C.E., Costa, L.G., 2010. The toxicity of mixtures of specific organophosphate compounds is modulated by paraoxonase 1 status. *Adv. Exp. Med. Biol.* 660, 47–60.
- 10.- **Costa**, L.G., Richter, R.J., Li, W.-F., Cole, T., Guizzetti, M., Furlong, C.E., 2003. Paraoxonase (PON 1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomark. Biochem. Indic. Expo. Response Susceptibility Chem.* 8, 1–12.
- 11.- **Da Silva**, J., Moraes, C.R., Heuser, V.D., Andrade, V.M., Silva, F.R., Kvitko, K., Emmel, V., Rohr, P., Bordin, D.L., Andreazza, A.C., Salvador, M., Henriques, J.A.P., Erdtmann, B., 2008. Evaluation of genetic damage in a Brazilian population occupationally exposed to pesticides and its correlation with polymorphisms in metabolizing genes. *Mutagenesis* 23, 415–422.
- 12.- **Davis**, K.A., Crow, J.A., Chambers, H.W., Meek, E.C., Chambers, J.E., 2009. Racial differences in paraoxonase-1 (PON1): a factor in the health of southerners? *Environ. Health Perspect.* 117, 1226–1231.
- 13.- **Deakin**, S., Leviev, I., Brulhart-Meynet, M.-C., James, R.W., 2003. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position -

107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem. J.* 372, 643–649.

14.- **El-Demerdash**, F.M., 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 49, 1346–1352.

15.- **Ellison**, C.A., Crane, A.L., Bonner, M.R., Knaak, J.B., Browne, R.W., Lein, P.J., Olson, J.R., 2012. PON1 status does not influence cholinesterase activity in Egyptian agricultural workers exposed to chlorpyrifos. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 265, 308–315. doi:10.1016/j.taap.2012.08.031

16.- **Elsharkawy**, E.E., Yahia, D., El-Nisr, N.A., 2013. Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: attenuation by glutathione. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 35, 218–227.

17.- **Fuhrman**, B., 2012. Regulation of hepatic paraoxonase-1 expression. *J. Lipids* 2012, 684010.

18.- **Furlong**, C., Suzuki, S., Stevens, R., Marsillach, J., Richter, R., Jarvik, G., Checkoway, H., Samii, A., Costa, L., Griffith, A., Roberts, J., Yearout, D., Zabetian, C., 2010. Human PON1, a biomarker of risk of disease and exposure. *Chem. Biol. Interact.* 187, 355–361.

19.- **Gamboa**, R., Zamora, J., Rodríguez-Pérez, J.M., Frago, J.M., Cardoso, G., Posadas-Romero, C., Vargas-Alarcón, G., 2006. Distribution of paraoxonase PON1 gene polymorphisms in Mexican populations. Its role in the lipid profile. *Exp. Mol. Pathol.* 80, 85–90.

20.- **Gamlin**, J., Romo, P.D., Hesketh, T., 2007. Exposure of young children working on Mexican tobacco plantations to organophosphorous and carbamic pesticides, indicated by cholinesterase depression. *Child Care Health Dev.* 33, 246–248. doi:10.1111/j.1365-2214.2006.00702.x

21.- **Goswami**, B., Tayal, D., Gupta, N., Mallika, V., 2009. Paraoxonase: a multifaceted biomolecule. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 410, 1–12.

22.- **Gupta**, N., Singh, S., Maturu, V.N., Sharma, Y.P., Gill, K.D., 2011. Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms, haplotypes and activity in predicting cad risk in North-West Indian Punjabis. *PLoS One* 6, e17805.

23.- **Hernández**, A.F., López, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J.L., Parrón, T., Alvarez, J.C., Lorente, J.A., Pla, A., 2005. Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol. Lett.* 159, 13–21.

24.- **Hernández**, A.F., Mackness, B., Rodrigo, L., López, O., Pla, A., Gil, F., Durrington, P.N., Pena, G., Parrón, T., Serrano, J.L., Mackness, M.I., 2003. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Hum. Exp. Toxicol.* 22, 565–574.

25.- **Heuser**, V.D., Erdtmann, B., Kvitko, K., Rohr, P., da Silva, J., 2007. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility.

Toxicology 232, 235–247.

26.- **Holland**, N., Furlong, C., Bastaki, M., Richter, R., Bradman, A., Huen, K., Beckman, K., Eskenazi, B., 2006. Paraoxonase polymorphisms, haplotypes, and enzyme activity in Latino mothers and newborns. *Environ. Health Perspect.* 114, 985–991.

27.- **Hreljac**, I., Zajc, I., Lah, T., Filipic, M., 2008. Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 360–367.

28.- **Jansen**, K.L., Cole, T.B., Park, S.S., Furlong, C.E., Costa, L.G., 2009. Paraoxonase 1 (PON1) modulates the toxicity of mixed organophosphorus compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 142–153.

29.- **Jintana**, S., Sming, K., Krongtong, Y., Thanyachai, S., 2009. Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82, 833–842. doi:10.1007/s00420-009-0422-9

30.- **Kamanyire**, R., **Karalliedde**, L., 2004. Organophosphate toxicity and occupational exposure. *Occup. Med. Oxf. Engl.* 54, 69–75.

31.- **Karami-Mohajeri**, S., **Abdollahi**, M., 2011. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 1119–1140.

32.- **Kashyap**, M.P., Singh, A.K., Kumar, V., Tripathi, V.K., Srivastava, R.K., Agrawal, M., Khanna, V.K., Yadav, S., Jain, S.K., Pant, A.B., 2011. Monocrotophos induced apoptosis in PC12 cells: role of xenobiotic metabolizing cytochrome P450s. *PLoS One* 6, e17757.

33.- **Kisby**, G.E., Muniz, J.F., Scherer, J., Lasarev, M.R., Koshy, M., Kow, Y.W., McCauley, L., 2009. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. *J. Agromedicine* 14, 206–214.

34.- **Koureas**, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A., Hadjichristodoulou, C., 2011. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicol. Lett.*

35.- **Kryston**, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., Georgakilas, A.G., 2011. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat. Res.* 711, 193–201.

36.- **Leviev**, I., **James**, R.W., 2000. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 516–521.

37.- **Liu**, Y.-J., Huang, P.-L., Chang, Y.-F., Chen, Y.-H., Chiou, Y.-H., Xu, Z.-L., Wong, R.-H., 2006. GSTP1 genetic polymorphism is associated with a higher risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* 15, 659–666.

38.- **López-Flores**, I., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Aguilar-Garduño, C., Sanchez-Villegas, P., Pérez-Méndez, O.A., Gamboa-Avila, R., 2009a. Relationship between human

paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Lett.* 188, 84–90.

39.- **Marsillach**, J., Ferré, N., Vila, M.C., Lligoña, A., Mackness, B., Mackness, M., Deulofeu, R., Solá, R., Parés, A., Pedro-Botet, J., Joven, J., Caballeria, J., Camps, J., 2007. Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease. *Clin. Biochem.* 40, 645–650.

40.- **McCauley**, L.A., Lasarev, M., Muniz, J., Nazar Stewart, V., Kisby, G., 2008. Analysis of pesticide exposure and DNA damage in immigrant farmworkers. *J. Agromedicine* 13, 237–246.

41.- **Moore**, P.D., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B., 2010. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environ. Toxicol.* 25, 221–226.

42.- **Muniz**, J.F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y.W., Nazar-Stewart, V., G.E., 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 227, 97–107.

43.- **Ojha**, A., Yaduvanshi, S.K., Pant, S.C., Lomash, V., Srivastava, N., 2011. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by three commonly used organophosphate pesticides individually and in mixture, in rat tissues. *Environ. Toxicol.*

44.- **Olgun**, S., Gogal, R.M., Jr, Adeshina, F., Choudhury, H., Misra, H.P., 2004. Pesticide mixtures potentiate the toxicity in murine thymocytes. *Toxicology* 196, 181–195.

45.- **OPS**. (2008). Alcohol y atención primaria de la salud: informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas. Washington, D.C.

46.- **Otocka-Kmieciak, A., Orłowska-Majdak, M.**, 2009. The role of genetic (PON1 polymorphism) and environmental factors, especially physical activity, in antioxidant function of paraoxonase. *Postępy Hig. Med. Dośw. Online* 63, 668–677.

47. - **Precourt**, L.-P., Seidman, E., Delvin, E., Amre, D., Deslandres, C., Dominguez, M., Sinnett, D., Levy, E., 2009. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1628–1637.

48.- **Rahman**, M.F., Mahboob, M., Danadevi, K., Saleha Banu, B., Grover, P., 2002. Assessment of genotoxic effects of chlorpyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutat. Res.* 516, 139–147.

49.- **Richter**, R.J., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2008. Determination of paraoxonase 1 status without the use of toxic organophosphate substrates. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 1, 147–152.

50.- **Richter**, R.J., Jarvik, G.P., Furlong, C.E., 2009. Paraoxonase 1 (PON1) status and substrate hydrolysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 235, 1–9.

51.- **Rojas-García**, A.E., Medina-Díaz, I.M., Robledo-Marenco, M. de L., Barrón-Vivanco, B.S., Girón-Pérez, M.I., Velázquez-Fernández, J.B., González-Arias, C.A., Albores-Medina,

A., Quintanilla-Vega, B., Ostrosky-Wegman, P., Rojas-García, M.C., Pérez-Herrera, N.E., López-Flores, J.F., 2011. Hematological, biochemical effects, and self-reported symptoms in pesticide retailers. *J. Occup. Environ. Med. Am. Coll. Occup. Environ. Med.* 53, 517–521.

52.- **Rojas-García**, A.E., Solís-Heredia, M.J., Piña-Guzmán, B., Vega, L., López-Carrillo, L., Quintanilla-Vega, B., 2005. Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 282–289.

53.- **Rojas-García**, A.E., Sordo, M., Vega, L., Quintanilla-Vega, B., Solis-Heredia, M., Ostrosky-Wegman, P., 2009. The role of paraoxonase polymorphisms in the induction of micronucleus in paraoxon-treated human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 823–829.

54.- **Sánchez-Guerra**, M., Pérez-Herrera, N., Quintanilla-Vega, B., 2011. Organophosphorous pesticides research in Mexico: epidemiological and experimental approaches. *Toxicol. Mech. Methods* 21, 681–691.

55.- **Simoniello**, M.F., Kleinsorge, E.C., Scagnetti, J.A., Grigolato, R.A., Poletta, G.L., Carballo, M.A., 2008. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J. Appl. Toxicol. JAT* 28, 957–965.

56.- **Singh**, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.

57.- **Singh**, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B.D., Rautela, R.S., Grover, S.S., Rawat, D.S., Pasha, S.T., Jain, S.K., Ichhpujani, R.L., Rai, A., 2011. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 252, 130–137.

58.- **Sirivarasai**, J., Kaojarern, S., Yoovathaworn, K., Sura, T., 2007. Paraoxonase (PON1) polymorphism and activity as the determinants of sensitivity to organophosphates in human subjects. *Chem. Biol. Interact.* 168, 184–192.

59.- **Soltaninejad**, K., **Abdollahi**, M., 2009. Current opinion on the science of organophosphate pesticides and toxic stress: a systematic review. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 15, RA75–90.

60.- **Tarkowski**, M., Lutz, W., Birindelli, S., 2004. The lymphocytic cholinergic system and its modulation by organophosphorus pesticides. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 17, 325–337.

61.- **Vakonaki**, E., Androutsopoulos, V.P., Liesivuori, J., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., 2013. Pesticides and oncogenic modulation. *Toxicology* 307, 42–45.

62.- **Wong**, R.-H., Chang, S.-Y., Ho, S.-W., Huang, P.-L., Liu, Y.-J., Chen, Y.-C., Yeh, Y.-H., **Lee**, H.-S., 2008. Polymorphisms in metabolic GSTP1 and DNA-repair XRCC1 genes with an increased risk of DNA damage in pesticide-exposed fruit growers. *Mutat. Res.* 654, 168–175.

63.- **Worek**, F., Mast, U., Kiderlen, D., Diepold, C., Eyer, P., 1999. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 288, 73–90.