



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA**

**UNIDAD ESPECIALIZADA DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**ACTIVIDAD Y POLIMORFISMOS EN SOD Y GST Y SU RELACIÓN CON ADNmt  
EN FUMIGADORES**

**T E S I S**

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

**PRESENTA**

**QBP.** Flor Deyanira Jaimes Rendon

**Director:** Dr. Gerardo Huerta Beristaín

**Codirectora:** Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

**Chilpancingo, Gro. Marzo del 2018.**



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

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 15 días del mes de noviembre de dos mil diecisiete se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Actividad y polimorfismos en SOD y GST y su relación con ADNmt en fumigadores", presentada por la alumna Flor Deyanira Jaimes Rendón, 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

Dr. Gerardo Huerta Beristaín  
Dirección de tesis

Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán

Dr. Lorenzo Salgado Goytia

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Dra. Leticia Gpe. Yáñez Estrada



UAGro  
Coordinación del  
Posgrado de la FCQB

**Coordinación 2014-2018**  
Dra. Paola Berja Rojas  
Coordinadora del Posgrado de la Facultad de  
Ciencias Químico Biológicas



UAGro  
Unidad Académica  
de Ciencias Químico Biológicas

**DIRECCIÓN**  
Dra. Amalia Vences Velázquez  
Directora de la Facultad de Ciencias Químico  
Biológicas

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro, en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero.

Bajo la dirección del:

**Dr. Gerardo Huerta Beristáin**

Con la codirección de la:

**Dra. Ma. Elena Moreno Godínez**

Y la asesoría de:

**Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán**

**Dra. Leticia G. Yáñez Estrada**

**Dr. Lorenzo Salgado Goytia**

Durante el periodo en el que la C. Flor Deyanira Jaimes Rendon cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas recibió beca de CONACYT número 704579.

## Agradecimientos

El apoyo que me fue brindado en el laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental para la realización de mi trabajo de tesis, a la Dra. Ma. Elena Moreno Godínez responsable de este laboratorio. Agradezco en general a todos los que forman parte de este laboratorio por su compañerismo, actitud positiva y amigable, la cual influyo para trabajar en un ambiente armonioso.

A la Dra. Mónica Espinoza Rojo por todo su apoyo para llevar a cabo la estandarización, validación y cuantificación de los niveles circulantes de ADNmt, con equipo, materiales y asesoría personal.

A la Dra. Natividad Castro Alarcón, Dr. Daniel Hernández Sotelo y a la Dra. Eugenia Flores Alfaro por permitirme el uso de su equipo de laboratorio.

A mi comité evaluador formado por el Dr. Gerardo Huerta Beristaín, Dra. Ma. Elena Moreno Godínez, Dra. Iris Paola Guzman Guzman, Dr. Lorenzo Salgado Goytia y a la Dra. Leticia Guadalupe Yáñez Estrada por las observaciones y revisiones de mi trabajo, que hicieron posible el mejoramiento del mismo, que conllevo a la impresión y presentación final para obtener el grado como Maestra en Ciencias Biomédicas.

Al Ent. Fernando Damián Montaña y a los trabajadores de la sección 77 del SNTSA de la Secretaria de Salud, por su amable y entusiasta participación en el desarrollo de este trabajo.

## Dedicatorias

Con todo mi amor te agradezco y te dedico este logro a ti mamá, porque también te pertenece a ti, gracias por todo tu amor, cariño y comprensión por tener fe en mí, he logrado cumplir esta meta tan importante en mi vida, Te amo Mamá.

Gracias a mi papá y hermanas por brindarme su cariño y apoyarme para cumplir este sueño.

Gracias a todos mis compañeros de la Maestría por impulsarme a dar lo mejor de mí, especialmente a mis amigos Oscar Zaragoza, Claudia Paola, Blanca Guadalupe, Rubén y Dalia, ustedes fueron para mí un ejemplo de lucha y perseverancia, gracias a ustedes y porque estuvieron a mi lado logre culminar esta etapa de mi vida.

Especialmente quiero agradecer a mi compañera de desilusiones Nataly González Basilio, sé que para ambas fue difícil sacar adelante este proyecto, pero nunca nos rendimos, luchamos y perseveramos. Te deseo lo mejor en todos los proyectos que vengan para ti, mucha suerte.

Gracias Dr. Gerardo por ser un buen director de tesis y por ser un buen amigo también, siempre tenía una palabra de aliento para mí y se lo agradezco mucho.

Flor Deyanira

## Índice

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
<b>Índice de cuadros</b>	
<b>Índice de figuras</b>	
<b>Índice de anexos</b>	
<b>Resumen</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>I. Marco teórico</b>	<b>1</b>
1.1 Plaguicidas	1
1.2 Plaguicidas organofosforados	2
1.3 Enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa y Glutación S-transferasa	5
1.4 ADN mitocondrial	7
<b>II. Pregunta de investigación</b>	<b>9</b>
<b>III. Justificación</b>	<b>9</b>
<b>IV. Hipótesis</b>	<b>10</b>
<b>V. Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>VI. Diseño metodológico</b>	<b>11</b>
<b>VI.I Materiales y métodos</b>	<b>12</b>
<b>VI.II Diagrama de trabajo</b>	<b>17</b>
<b>IX. Resultados</b>	<b>18</b>
<b>X. Discusión</b>	<b>29</b>
<b>XI. Conclusiones</b>	<b>34</b>
<b>XII. Perspectivas y sugerencias</b>	<b>35</b>
<b>XIII. Anexos</b>	<b>36</b>
<b>XIV. Referencias</b>	<b>59</b>

## Índice de cuadros

<b>Cuadros</b>	<b>Pág.</b>
Cuadro 1. Características generales de la población de estudio.	19
Cuadro 2. Evaluación de la exposición a plaguicidas y otros parámetros de los fumigadores del Sector Salud.	20
Cuadro 3. Tipos de plaguicidas y frecuencia de uso por los fumigadores.	22
Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C47T en el gen SOD2 de la población expuesta y no expuesta a plaguicidas.	26
Cuadro 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A313G en el gen GSTP1 de la población expuesta y no expuesta a plaguicidas.	27

## Índice de figuras

<b>Figuras</b>	<b>Pág.</b>
Figura 1. Comparación de la actividad enzimática de AChE (A) y BuChE (B) entre los grupos de estudio.	23
Figura 2. Actividad enzimática de SOD (U/mL). (A) Comparación entre grupos de estudio (expuestos vs no expuestos). (B) Días transcurridos de la última aplicación de plaguicidas. (C) Síntomas de intoxicación.	24
Figura 3. Actividad enzimática de GST (U/mL). (A) Comparación entre grupos de estudio (expuestos vs no expuestos). (B) Días transcurridos de la última aplicación de plaguicidas. (C) Síntomas de intoxicación.	25
Figura 4. Comparación de los niveles de ADNc total entre los grupos de estudio.	28
Figura 5. Comparación de los niveles e integridad del ADNmt entre los grupos de estudio. (A) Los niveles relativos de ADNmt-79. (B) ADNmt-230. (C) la integridad del ADNmt.	29

Figura 6. Comparación de los niveles de ADNmt-79 con los años de exposición.	30
Figura 7. Comparación de los niveles de ADNmt-79 con el índice de exposición.	30
Figura 8. Relación de los niveles de ADNmt-79 con el último plaguicida utilizado.	31
Figura 9. Relación del ADNmt-79 con el número de plaguicidas utilizados.	32
Figura 10. Comparación de los niveles de ADNmt-79 con la presencia de síntomas de intoxicación.	33

---

## Índice de anexos

<b>Anexos</b>	<b>Pág.</b>
Anexo I. Consentimiento informado.	41
Anexo II. Encuesta (Grupo de estudio expuestos).	43
Anexo III. Encuesta (Grupo de estudio no expuestos).	51
Anexo IV. Método de purificación de ADN a partir de sangre o fluidos corporales.	58
Anexo V. Protocolo para la extracción de ADN mediante la técnica rápida no enzimática en muestras de sangre periférica.	60
Anexo VI. Estandarización de la qPCR para cuantificar los niveles de ADNmt circulante.	61
Anexo VII. Historial de síntomas de intoxicación de los fumigadores.	70

---

## Resumen

**Introducción:** Los plaguicidas organofosforados, carbamatos y piretroides son los plaguicidas más utilizados en México para el control de vectores; no obstante que se ha reportado que éstos pueden causar daños a la salud asociado a sus propiedades tóxicas, tal como la generación estrés oxidativo, por lo que, el biomonitoreo de poblaciones expuestas ocupacionalmente a éstos compuestos químicos utilizando biomarcadores de susceptibilidad y efecto cobran vital relevancia, así como la implementación de biomarcadores más sensibles. **Objetivo:** Evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión S-transferasa (GST) y los polimorfismos *SOD2-C47T* y *GSTP1-A313G*, con los niveles de ADN mitocondrial (ADNmt) en personas con exposición ocupacional a plaguicidas. **Métodos:** Se analizaron 105 muestras de individuos, 49 fumigadores (expuestos) y 56 no expuestos. Las actividades enzimáticas de la acetilcolinesterasa (AChE), butirilcolinesterasa (BuChE), SOD y GST se midieron por espectrofotometría. La genotipificación de los polimorfismos y los niveles de ADNmt en suero (ADNmt-79 y ADNmt-230) se analizaron por PCR en tiempo real. **Resultados:** La actividad de AChE, BuChE, SOD y GST no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio. La actividad de SOD y GST se relacionaron negativamente con la presencia de síntomas de intoxicación ( $r = -0.45$ ,  $p = 0.01$ ), y con el tiempo de la última aplicación ( $r = -0.40$   $p = 0.01$ ), respectivamente. Los alelos T y G de los polimorfismos *SOD2-C47T* y *GSTP1-A313G* se encontraron en mayor frecuencia, sin embargo no se relacionaron con la actividad enzimática de SOD y GST, ni con características relacionadas a la intoxicación por plaguicidas. Los niveles de ADNmt-79 ( $p = 0.007$ ) y ADNmt-230 ( $p = 0.2$ ) se encontraron incrementados en los fumigadores en comparación con los no expuestos; sin embargo éstos no se relacionaron con la actividad de las enzimas antioxidantes, ni con los polimorfismos. Los niveles de ADNmt-79 se correlacionaron con el tipo y número de plaguicidas utilizados, años de actividad laboral y número de síntomas de intoxicación. **Conclusiones:** En este estudio, los niveles de ADNmt representan un biomarcador de daño asociado a la exposición crónica a plaguicidas; sin embargo se requieren más estudios que permitan discernir si el empleo del ADNmt es un mejor biomarcador de efecto de la exposición ocupacional a plaguicidas.

**Palabras Claves:** Plaguicidas, ADNmt, SOD, GST y exposición ocupacional.

## Abstract

**Introduction:** Organophosphorus pesticides, carbamates and pyrethroids are the most used pesticides in Mexico for the control of vectors; although it has been reported that these can cause health damage associated with their toxic properties, such as the generation of oxidative stress, therefore, the biomonitoring of populations occupationally exposed to these chemical compounds using biomarkers of susceptibility and effect become vitally important. , as well as the implementation of more sensitive biomarkers. **Objective:** To evaluate the activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST) and polymorphisms *SOD2-C47T* and *GSTP1-A313G*, with levels of mitochondrial DNA (mtDNA) in people with occupational exposure to pesticides. **Methods:** 105 samples from individuals, 49 fumigators (exposed) and 56 non-exposed were analyzed. The enzymatic activities of acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BuChE), SOD and GST were measured by spectrophotometry. Genotyping of polymorphisms and serum mtDNA levels (mtDNA-79 and mtDNA-230) were analyzed by real-time PCR. **Results:** The activity of AChE, BuChE, SOD and GST did not show significant differences between the study groups. The activity of SOD and GST were negatively related to the presence of symptoms of intoxication ( $r = -0.45$ ,  $p = 0.01$ ), and with the time of the last application ( $r = -0.40$   $p = 0.01$ ), respectively. The T and G alleles of the polymorphisms *SOD2-C47T* and *GSTP1-A313G* were found in greater frequency, however they were not related to the enzymatic activity of SOD and GST, nor with characteristics related to pesticide poisoning. The levels of mtDNA-79 ( $p = 0.007$ ) and mtDNA-230 ( $p = 0.2$ ) were found increased in the fumigators compared to those not exposed; however, these were not related to the activity of antioxidant enzymes or polymorphisms. The levels of mtDNA-79 were correlated with the type and number of pesticides used, years of work activity and number of symptoms of poisoning. **Conclusions:** In this study, mtDNA levels represent a biomarker of damage associated with chronic exposure to pesticides; however, more studies are needed to discern whether the use of mtDNA is a better biomarker of the effect of occupational exposure to pesticides.

**Key words:** Pesticides, mtDNA, SOD, GST and occupational exposure.

## **I. Marco Teórico**

### **1.1 Plaguicidas**

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), define como plaguicida “la sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, controlar o destruir cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de animales” (FAO, 2012).

Los plaguicidas se clasifican de acuerdo a su toxicidad aguda, vida media, uso y su estructura química (Fernández *et al.*, 2010). De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en organoclorados, carbamatos y piretroides, entre otros. Los plaguicidas más utilizados por las instituciones de salud para el control de vectores en México son carbamatos, organofosforados y piretroides, y en este trabajo nos centraremos en los plaguicidas organofosforados (POF) (Barros *et al.*, 2016).

#### **1.1.1 Carbamatos**

Son productos derivados del ácido carbámico (HO-CO-NH<sub>2</sub>) con sustitución tanto en el grupo amino como carboxilato. Los plaguicidas carbámicos tienen la siguiente estructura (R<sup>1</sup>-NH<sub>2</sub>-CO-OR<sup>2</sup>) donde, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son grupos alquilo o arilo (Rendón, 2013). La degradación de estos compuestos se lleva a cabo por reacciones de N-demetilación, hidroxilación, o-dealquilación o sulfoxidación. Inhiben a las colinesterasas de manera reversible por un mecanismo similar a los POF, produciendo AChE carbamilada que aparece más rápidamente pero es más inestable que su equivalente fosforilado debido a que su enlace es electrovalente y no covalente. Estos plaguicidas se absorben por diferentes vías de exposición, con respecto a la cutánea, varía considerablemente de un producto a otro, donde difunden rápidamente a la sangre y se distribuyen en todos los tejidos, pero no se acumulan (Requena, 2009).

#### **1.1.2 Piretroides**

Los piretroides son productos sintéticos derivados de las piretrinas, los cuales son insecticidas naturales obtenidos de crisantemos o piretros. Estos plaguicidas son más estables que las piretrinas y con mejor efecto residual (Ensley, 2012). En el

aire, muchos de los piretroides son degradados rápidamente (uno a dos días) por la luz solar o por otros compuestos que se encuentran en la atmósfera. Los piretroides se adhieren firmemente al suelo y eventualmente son degradados por microorganismos del suelo y el agua. La exposición aguda a concentraciones muy altas de estos compuestos presentes en el aire, los alimentos o el agua, puede causar mareo, dolor de cabeza, náusea, espasmos musculares, falta de energía, alteraciones de la conciencia, convulsiones y pérdida del conocimiento. Algunos estudios realizados en modelos animales expuestos a estos contaminantes, han demostrado una reducción de la fertilidad tanto en machos como en hembras. No hay ninguna evidencia de que las piretrinas o los piretroides producen cáncer en seres humanos o en animales (Du *et al.*, 2013).

## **1.2 Plaguicidas organofosforados**

Los POF son compuestos orgánicos de tipo éster o amida que tienen un átomo de fósforo, están ampliamente distribuidas en el mundo y tienen aplicaciones en la agricultura para mejorar la calidad y la cantidad de los alimentos y en el Sector Salud, para el control de vectores de dengue, zika y chikunguya. Estos compuestos son lipofílicos, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro (Soltaninejad y Shadnia, 2014).

### **1.2.1 Toxicocinética y Toxicodinamia**

La principal ruta de exposición a POF es a través de la absorción cutánea, principalmente en trabajadores agrícolas quienes están en mayor contacto con ellos, al aplicarlos y permanecer en los cultivos durante largos periodos de tiempo, debido a que atraviesan fácilmente la barrera dérmica y la absorción es prácticamente total, pero no se realiza de manera homogénea en las diferentes zonas corporales, factores como la temperatura, la humedad y la formulación del producto influirán en la difusión del mismo. Los POF también pueden absorberse por vía oral por la ingesta de productos contaminados y por vía inhalatoria durante la aplicación de estos compuestos químicos. Una vez en sangre, tanto los compuestos inalterados como sus metabolitos se distribuyen por todo el cuerpo, especialmente en el SNC, el hígado y los riñones (London *et al.*, 2012).

Éstos son metabolizados principalmente en el hígado por enzimas como (las esterasas, enzimas microsomales y transferasas entre otras) conformando principalmente seis metabolitos dialquilfosfatos (DAPs) los cuales son hidrofílicos, facilitando su excreción por vía renal (Burns *et al.*, 2013; Ramírez *et al.*, 2014).

Los POF son activados metabólicamente por desulfuración oxidativa por acción de las enzimas hepáticas como el citocromo P450, generando compuestos oxonificados (oxones), que son los responsables de la toxicidad de estos contaminantes, al inhibir las hidrolasas de éster de carboxilo, principalmente la enzima acetilcolinesterasa (AChE), la cual hidroliza al neurotransmisor acetilcolina (ACh) (Kazemi *et al.*, 2012). El cuadro de intoxicación por POF genera un espectro de signos y síntomas característicos, conocido como síndrome colinérgico, debido a la acumulación de ACh en el espacio sináptico, presentándose por tanto, una excesiva estimulación de los receptores de ésta, que se caracteriza principalmente por efectos nicotínicos (cefalea, taquicardia y mialgia entre otros), efectos muscarínicos (miosis, visión borrosa, excesiva actividad secretora y disnea entre otros) y efectos sobre el SNC (cambios en el estado de conciencia, ataxia y convulsiones entre otros) (Fernández *et al.*, 2010).

Hay evidencias que indican que la exposición crónica a POF puede tener efectos adversos sobre la salud; por ejemplo se han asociado con un aumento en la incidencia de linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, sarcoma de tejidos blandos, sarcoma de pulmón, cáncer de páncreas, estómago, hígado, vejiga y la vesícula biliar, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y alteraciones en el sistema reproductivo, entre otros (Kapka *et al.*, 2011). Así como también se ha asociado la exposición crónica a POF con la neuropatía retardada (Eskenazi *et al.*, 2007).

### **1.2.2 Aspectos epidemiológicos**

El uso y la variedad de plaguicidas se ha incrementado dramáticamente a nivel mundial con el aumento de la población y de la producción agrícola (Zhang *et al.*, 2011). Los casos de intoxicación aguda por plaguicidas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, especialmente en países en desarrollo (Vikkey *et al.*, 2017).

De acuerdo a estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año entre 500,000 y 1 millón de personas se intoxican con plaguicidas y entre 5,000 y 20,000 mueren (Dawson *et al.*, 2010).

Los POF son los plaguicidas de elección en la mayoría de los países (Kazemi *et al.*, 2012). De esta manera, se han vuelto cada vez más populares, tanto para uso agrícola como en el Sector Salud (Kumar *et al.*, 2010). El uso generalizado y la accesibilidad de éstos se han traducido en un mayor número de envenenamientos humanos especialmente en los países en desarrollo. El número de intoxicaciones con POF se estima en tres millones por año (Maiti *et al.*, 2011).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) reportó que, entre 1995 y 2012 las cifras de intoxicaciones por plaguicidas se incrementó, registrándose un total de 67,711 casos de envenenamiento en el país, los principales reportes se presentaron en los estados de Colima, Nayarit, Morelos, Jalisco y Guerrero. En 2010, se reportaron 3,068 casos de intoxicación con plaguicidas en la República Mexicana, siendo el estado de Jalisco el que presentó el mayor número de eventos, seguido por el Estado de México, Guerrero, Chiapas, Veracruz, Nayarit, Michoacán, Morelos y Oaxaca. El mayor número de sucesos se presentó en hombres con 2,167 reportes, en comparación con 901 casos en mujeres (SINAVE, 2013).

### **1.2.3 Daño oxidativo por exposición a POF**

Además del daño neurotóxico ocasionado por la exposición a POF, estos compuestos químicos también se han asociado con estrés oxidativo (Hongsibsong *et al.*, 2017). El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes del organismo, lo que ocasiona un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), mediado por enzimas tales como lipoxigenasas, peroxidasas y deshidrogenasas (Halliwell y Gutteridge, 1999), provocando lesión tisular (Nurulain *et al.*, 2013), siendo la peroxidación lipídica y el daño oxidativo al ADN, de las principales afectaciones celulares por este excedente de ROS (Dantoine *et al.*, 2003; Taghavian *et al.*, 2017). Recientemente se ha reportado que el metamidofos (POF), induce estrés oxidativo, evidenciando por el incremento en los niveles de malondialdehído (producto final de la peroxidación de lípidos), como consecuencia de la generación de ROS, en

cultivos primarios de células mononucleares humanas de sangre periférica (Ramírez-Vargas *et al.*, 2015).

El estrés oxidativo también se ha visto asociado con la fisiopatología de diversas enfermedades, como por ejemplo, en la neurodegeneración de la enfermedad de Alzheimer; la enfermedad de Parkinson, cataratas, aterosclerosis, enfermedades neoplásicas, diabetes, enfermedades inflamatorias crónicas del tracto gastrointestinal, envejecimiento de la piel, asma y entre otras (Terry, 2012).

### **1.3 Enzimas antioxidantes: Superóxido dismutasa y Glutación S-transferasa**

En el organismo, la neutralización de ROS se lleva a cabo mediante la acción de sistemas antioxidantes, con el objetivo de proteger a las células del daño oxidativo inducido por éstas (Da Costa *et al.*, 2012; Espinosa-Diez *et al.*, 2015).

Las enzimas superóxido dismutasa (SOD), juegan un papel importante debido a su capacidad de inhibir la acumulación de radicales superóxido y en consecuencia la peroxidación de lípidos, catalizando la conversión de radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y  $O_2$  (Case, 2017). En los mamíferos, se han identificado tres isoformas de SOD: CuZn-SOD (SOD1), que se encuentra en el citoplasma; Mn-SOD (SOD2), que se distribuye en la matriz mitocondrial; y SOD (SOD3), que es una enzima extracelular que se localiza en fluidos, tales como la linfa, líquido sinovial y plasma (Watanabe *et al.*, 2014). Los genes que codifican para estas enzimas se encuentran en diferentes cromosomas y en todos éstos se han descrito diferentes polimorfismos (Kinnula *et al.*, 2004). El gen *SOD2* se encuentra en el cromosoma 6q25 e incluye 6 exones, que abarcan 14 kb (Chen *et al.*, 2012). Un polimorfismo de nucleótido único (SNP por sus siglas en inglés) ha sido identificado en el gen *SOD2* (Wang *et al.*, 2001). Este polimorfismo consiste en el cambio de una citosina (C) por una timina (T) en la posición 47 (de ahí su nombre C47T), el cual se traduce en el cambio de un aminoácido, de alanina (Ala) por valina (Val) en la posición 16 (Ala16Val) del péptido señal de la enzima. Este polimorfismo afecta la estructura secundaria y la orientación mitocondrial de la proteína MnSOD, alterando su incorporación a la matriz mitocondrial, lo que causa acumulación de ROS en la célula (Kinnula *et al.*, 2004; Shimoda *et al.*, 1996). Algunos autores sugieren un papel protector para el alelo 47C en el asma bronquial,

mientras que la presencia del alelo 47T se ha asocia con disminución de la actividad de MnSOD (Despotovic *et al.*, 2015).

Aunado a lo anterior, la presencia del genotipo TT (Val / Val) en el gen *SOD2* se ha asociado con un control deficiente de la diabetes en comparación con los genotipos CT (Ala / Val) y CC (Ala / Ala) (Flekac *et al.*, 2008).

Otra familia importante de enzimas antioxidantes es la de las glutatión-S-transferasas (GST). En los seres humanos, se conocen 22 miembros de esta familia, que se clasifican de acuerdo a su estructura. Las GST son diméricas, su actividad depende de la presencia de Glutatión (GSH) cuya, función principal es la desintoxicación de compuestos electrófilos reactivos, tales como metabolitos intermediarios, toxinas ambientales y productos del estrés oxidativo, ya sea donando un protón al radical libre del compuesto de interés, completando su orbital de electrones y por lo tanto neutralizándolo o bien, por conjugación con GSH generando tioles de fácil excreción urinaria (Toyoda *et al.*, 2017; Espinosa-Diez *et al.*, 2015).

En el humano, se han identificado ocho familias de genes que codifican las GST citosólicas solubles, éstas son, alfa (GSTA), mu (GSTM), theta (GSTT), pi (GSTP), sigma (GSTS), zeta (GSTZ), kappa (GSTK) y omega (GSTO) (Wei *et al.*, 2013).

El gen *GSTP1* está situado en el cromosoma 11q13, en el cual se ha identificado el polimorfismo A313G, el cual consiste en el cambio de un nucleótido de adenina (A) por una guanina (G) en la posición 313 (A313G), esto se traduce en un cambio de aminoácido de isoleucina (Ile) por Valina (Val) en el codón 105 (Ile105Val) del sitio activo de la enzima. Reportes en la literatura indican que este polimorfismo afecta la estabilidad térmica y la actividad catalítica de la enzima (Kim *et al.*, 2015), desencadenando en una reducción de la actividad enzimática tanto *in vitro* (Johansson *et al.*, 1998) como *in vivo* (Gresner *et al.*, 2007). También se ha reportado que la enzima GSTP1 esta sobreexpresada en varios tipos de tumores y que el alelo 313G, del polimorfismo A313G provoca una reducción de la actividad enzimática e incapacidad para metabolizar agentes antineoplásicos (Sailaja *et al.*, 2010).

Estudios en la literatura indican que los individuos homocigotos G/G (Ile / Ile), tienen el más alto nivel de actividad de GSTP1, así como que la variante GSTP1 313G se asocia con una menor estabilidad térmica y una alteración de la actividad catalítica en respuesta a una variedad de sustratos, en comparación con GSTP1 313A (Wei *et al.*, 2013).

La determinación de la actividad de estas enzimas, puede emplearse como un biomarcador de exposición a POF (Ngo *et al.*, 2010). Es importante resaltar que la respuesta a los compuestos tóxicos ambientales, está determinada por la capacidad metabólica del individuo, la cual depende de su variación genética y de los polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas responsables del metabolismo de estos compuestos, por ello es de suma importancia medir además de la actividad enzimática, la presencia de polimorfismos (Adad *et al.*, 2015).

#### **1.4 ADN mitocondrial**

Las mitocondrias son orgánulos de doble membrana ubicadas en el citoplasma de las células eucariotas y contienen su propio ADN (ADNmt). Además la mitocondria participa en el proceso de fosforilación oxidativa para producir el ATP requerido en diversas actividades celulares dependientes de energía (Malik y Czajka, 2013). Las células de los mamíferos, contienen entre 200 y 2000 mitocondrias/célula y de éstas, cada una posee de dos a diez copias de ADNmt (Lee y Wei, 2000). El ADN circulante (ADNc) está compuesto de ADN genómico o nuclear (ADNg) y ADNmt (Chen *et al.*, 2013).

El ADNc fue descrito por primera vez en 1940, frecuentemente se ha empleado como un patrón molecular asociado a muerte celular y daño tisular en varios trastornos agudos y crónicos (Tong y Lo, 2006; Tsang y Lo, 2007; Peters y Pretorius, 2011). Aunque los mecanismos biológicos de la liberación de ADNc en el torrente sanguíneo aún no son del todo claros, algunos reportes identifican a la apoptosis, la necrosis o a ambos como las principales fuentes de ADNc en suero y plasma (Jahr *et al.*, 2001; Pisetsky, 2012).

Algunos estudios reportados en la literatura muestran que los niveles plasmáticos tanto del ADN nuclear (ADNn) y ADNmt se alteran en distintas enfermedades (Wang *et al.*, 2015), tales como cáncer de próstata (Mehra *et al.*, 2007), infarto

agudo al miocardio (Wang *et al.*, 2015), sepsis (Kung *et al.*, 2012) y diabetes mellitus tipo 2 (Zhong *et al.*, 2000) entre otras, observándose una relación entre los niveles plasmáticos del ADNmt con un mal funcionamiento de diferentes órganos, cuya consecuencia es la muerte celular (Zhang *et al.*, 2010; Simmons *et al.*, 2013; Nakahira *et al.*, 2013). Así como también se ha reportado una alteración de los niveles de ADNc de los individuos que se encuentran en ambientes laborales, por ejemplo durante la exposición ocupacional a bajas dosis de radiación ionizante (Borghini *et al.*, 2014) o a productos químicos (Budnik *et al.*, 2013).

El ADNmt circulante que se escapa de la autofagia celular induce inflamación a través de un receptor de tipo toll 9 (TLR9) (Oka *et al.*, 2012), activa neutrófilos y aumenta la liberación de la metaloproteínasa de matriz 8 (MMP8), además, la interacción de TLR9 con ADNmt podría activar la señalización del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e incrementar la expresión de otras citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e interleucinas (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) (Julian *et al.*, 2013; Yu y Bennett, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

En comparación con el ADNn, el ADNmt es más susceptible al daño porque carece de histonas protectoras y tiene una baja capacidad de reparación, por lo que tiene una alta tasa de mutaciones y es particularmente vulnerable al daño inducido por ROS (Cannino *et al.*, 2009; Masayesva *et al.*, 2006).

Reportes en la literatura sugieren el empleo de los niveles de ADNmt circulante como biomarcador pronóstico, por su asociación con diversas patologías (Cáncer de próstata, infarto agudo al miocardio, sepsis) (Wang *et al.*, 2015).

En este sentido, Mehra *et al.*, (2007), observaron que los niveles más altos de ADNmt se relacionaban con una menor esperanza de vida en pacientes con cáncer de próstata, en comparación con los que presentaban niveles más bajos. Así mismo, Kung *et al.*, (2012), reportaron niveles de ADNmt significativamente mayores en pacientes en estado crítico con sepsis en comparación con los controles sanos, además las concentraciones de ADNmt fueron significativamente menores en los pacientes que sobrevivieron. Por otra parte, Nakahira *et al.*, (2013), analizaron los niveles de ADNmt en pacientes hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos (ICU), niveles de ADNmt elevado ( $\geq 3,200$  copias / mL de plasma) se relacionaban con un peor pronóstico, por lo que estos autores, sugieren

que el ADNmt circulante, puede ser empleado como un biomarcador de susceptibilidad y riesgo. Wang *et al.*, (2015), evaluaron los niveles plasmáticos de ADNmt en pacientes con infarto agudo al miocardio, con riesgo de infarto y clínicamente sanos; encontrando que los niveles de éste eran significativamente mayores en el primer grupo, concluyendo que el ADNmt, es potencialmente un biomarcador de susceptibilidad para pacientes con riesgo de infarto agudo al miocardio. A diferencia de los estudios clínicos, son escasos los reportes en la literatura que relacionen la exposición ocupacional con los niveles de ADNmt. Borghini *et al.*, (2014), observaron que los niveles ADNmt circulante en cardiólogos intervencionistas ocupacionalmente expuestos a bajas dosis de radiación ionizante, fueron estadísticamente superiores a los detectados en individuos no expuestos. Con respecto a la asociación entre los niveles de ADNmt y la exposición ocupacional a plaguicidas, Budnik *et al.*, (2013), analizaron dos fragmentos de ADNmt circulante, el ADNmt-79 (ADNmt-79pb) y el ADNmt-230 (ADNmt-230pb), en individuos expuestos a gases de plaguicidas haloalcanos, encontrando que los valores de las medias de ambos, fueron significativamente mayores en los individuos expuestos (ADNmt-79  $p = 0.0001$  y ADNmt-230  $p = 0.005$ ) en comparación con los no expuestos. Sugiriendo una vez más, que los niveles de ADNmt circulante pueden emplearse como biomarcador de inestabilidad mitocondrial, como consecuencia por la exposición ambiental a productos químicos cancerígenos.

## **II. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Los polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas antioxidantes SOD2 y GSTP1 y la actividad enzimática de éstas, se asocian con los niveles de ADNmt circulante, en fumigadores?

## **III. JUSTIFICACIÓN**

De acuerdo a la OMS, cada año entre 500,000 y un millón de personas se intoxican con plaguicidas y entre 5,000 y 20,000 mueren. Aproximadamente el 50% de los que se intoxican y el 75% de los que fallecen son trabajadores agrícolas, el resto se debe a envenenamientos por consumo de alimentos contaminados. En total, entre los dos grupos, la mortalidad alcanza la cifra de 220,000 defunciones al año.

Con respecto a nuestro país en el 2010 se reportaron 3,068 casos de intoxicación con plaguicidas, siendo el estado de Jalisco presentó el mayor número de eventos, seguido por el Estado de México, Guerrero, Chiapas, Veracruz, Nayarit, Michoacán, Morelos y Oaxaca.

Los POF son los compuestos químicos más utilizados en la mayoría de los países incluyendo a México, lo que vuelve a las poblaciones que se dedican a la agricultura y al control de enfermedades transmitidas por vectores, blancos idóneos de exposición a estos contaminantes.

Con base a los antecedentes previamente descritos, tanto la actividad enzimática, como los polimorfismos de las enzimas antioxidantes SOD y GST, pueden ser empleados como biomarcadores de susceptibilidad de daño oxidativo, en individuos expuestos a POF. Así mismo, los niveles de ADNmt circulante podrían ser un buen biomarcador de efecto de inestabilidad mitocondrial, como consecuencia de la exposición ambiental a productos químicos cancerígenos.

Por lo que se propone realizar un estudio para evaluar la susceptibilidad de daño oxidativo en individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas mediante, la detección de polimorfismos en los genes que codifican para las enzimas antioxidantes SOD2 y GSTP1, la actividad enzimática de éstas y los niveles de ADNmt circulante.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las variantes polimórficas de los genes que codifican para las enzimas SOD2 y GSTP1, y su actividad enzimática de éstas en fumigadores, se asocian con los niveles de ADNmt circulante.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **General**

- Evaluar la asociación de polimorfismos en las enzimas SOD2 y GSTP1 y su actividad antioxidante con los niveles de ADNmt circulante en fumigadores.

## Específicos

- Determinar la actividad de Acetilcolinesterasa eritrocitaria y Butirilcolinesterasa.
- Determinar la actividad enzimática sérica de SOD y GST.
- Caracterizar la frecuencia alélica y genotípica de los polimorfismos *SOD2* C47T y *GSTP1* A313G.
- Cuantificar los niveles circulantes de ADNmt en suero.

## VI. DISEÑO METODOLÓGICO

Se realizó un estudio transversal comparativo en fumigadores del Sector Salud e individuos no expuestos a plaguicidas, del estado de Guerrero, México.

Todas las determinaciones se realizaron en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la UAGro.

Variables evaluadas:

- **Dependientes:** Niveles de ADNmt circulante y la actividad enzimática de AChE, BuChE, SOD y GST.
- **Independientes:** Polimorfismos en los genes *SOD2* y *GSTP1*.
- **Covariables:** Edad, años de trabajo, el número y tipo de plaguicida utilizado, el periodo de aplicación más reciente, cantidad aplicada, el uso, tipo y número de material de protección empleado y la presencia de síntomas de intoxicación.

Todos los procedimientos se llevaron bajo consideraciones éticas de investigación, todos los participantes aceptaron participar en el presente estudio de manera voluntaria a través de la firma del consentimiento informado (Anexo I). En cuanto a las condiciones de bioseguridad se trabajó con base a la NOM-007-SSA3-2011, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos. El manejo de los RPBI, fue bajo los lineamientos de la NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Población de estudio**

La captación de la población se realizó previa sensibilización de la misma, en donde se les explicaron los objetivos del estudio, los beneficios que obtendrían del mismo, que su participación no tenía costo y que ésta era voluntaria, que podían retirarse en cuanto lo decidieran sin dar explicación alguna, que toda la información se manejaría de manera anónima, que el estudio no podía en riesgo en ningún momento su salud, que todo el material empleado sería nuevo y estéril. Aquellos que aceptaban participar, lo hicieron firmando la hoja del consentimiento informado (Anexo I).

Se seleccionaron en un muestreo no probabilístico hombres de entre 18 y 75 años de edad originarios y residentes de la zona Centro, Costa Chica y Costa Grande del estado de Guerrero. El grupo expuesto fue conformado por 49 fumigadores del Sector Salud, mientras que los no expuestos fueron 56 individuos con ocupación laboral ajena a la exposición directa a plaguicidas. En ambos grupos de estudio se excluyeron individuos con diagnóstico de diabetes mellitus, cardiopatías y cáncer, o bajo tratamiento con antioxidantes tipo fármaco e individuos genéticamente relacionados.

En una entrevista se les aplicó una encuesta con el fin de obtener información personal, sociodemográfica, hábitos alimenticios, consumo de alcohol, cigarro, experiencias de intoxicación y exposición a plaguicidas entre otros. En el Anexo II se muestra el cuestionario para los participantes ocupacionalmente expuestos (Fumigadores) y en el Anexo III el de los no expuestos ocupacionalmente.

### **Obtención de muestras**

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas mediante punción venosa, con el sistema Vacutainer™ (Becton, Dickinson and company) en tubos con EDTA (3 mL) y sin anticoagulante (5 mL), empleando siempre material nuevo y estéril y por personal capacitado, éstas fueron centrifugadas a 2,500 rpm por 10 minutos para obtener el paquete celular, el plasma o el suero, se conformaron diferentes alícuotas y según fuese la prueba a realizar, estas fueron procesadas de inmediato o almacenadas a 4° C o a -20° C, hasta su uso. En este estudio no fue considerado

el periodo de aplicación de plaguicidas por los fumigadores, para realizar el muestreo. Todas las muestras biológicas fueron destruidas durante su proceso de análisis, en el caso de que quedaran residuos, éstos fueron tratados de acuerdo a las Normas de Seguridad e Higiene que dicta la NOM- 087 ECOL. En ambos grupos de estudio se realizó la determinación de los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos.

### **Determinación de las pruebas bioquímicas**

Se determinó la concentración de los niveles séricos de glucosa, triglicéridos y colesterol total, realizando ensayos colorimétricos y empleando reactivos de la marca SPINREACT, en el equipo semiautomatizado SPINREACT (SPINLAB).

### **Actividad de enzimas propuestas como biomarcadores de exposición**

#### **AChE**

La actividad enzimática de AChE fue determinada por el método de Worek *et al.*, 1999. Se realizó una dilución 1:100 de las muestras de sangre de cada participante, para ello a 20 µL de sangre total recién obtenida en tubos con EDTA, se le adicionaron 2 mL del diluyente (solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, 0.1M más tritón 100-X ), se tomaron 500 µL de la dilución y se agregaron 1mL del amortiguador de fosfatos pH 7.4, 0.1M, 50 µL de DTNB (ácido 5,5´ -ditiobis-2-nitrato, 10mM) y 5 µL de Etpropazina (6mM), la mezcla fue incubada durante 10 minutos a 37 °C, posteriormente se agregaron 25 µL de yoduro de acetiltiocolina (28.3 mM). La absorbancia fue monitoreada durante 3 minutos a 436 nm. La actividad de AChE fue ajustada al contenido de Hb y expresada como U/gr de Hb.

#### **BuChE**

La actividad enzimática de butirilcolinesterasa (BuChE) fue determinada utilizando 3 mL de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, 0.1M, 100 µL de DTNB (ácido 5,5´ -ditiobis-2-nitrato, 10mM) y 10 µL de plasma recién extraído, la mezcla se incubó durante 10 minutos a 37°C, posteriormente se agregaron 50 µL de butiriltiocolina (63.2 mM). La absorbancia fue monitoreada durante 4 minutos a 405 nm. La actividad de BuChE fue expresada en U/L.

## **Extracción de ADN circulante y de ADN genómico**

La extracción de ADN circulante se realizó a partir de suero, empleando el Kit QIAamp® DNA Blood Mini (250) (Qiagen, Hilden, Germany), de acuerdo al protocolo del fabricante (Anexo IV). La obtención del ADN genómico se hizo a partir de la muestra de sangre completa (paquete celular) mediante la técnica rápida no enzimática de Miller *et al.*, 1998 (Anexo V). La cuantificación del ADN tanto genómico como del ADN circulante total se realizó espectrofotométricamente utilizando Nano Drop 2000, (Thermo Fischer, USA).

## **Determinación de ADN mitocondrial circulante por qPCR**

La determinación de los niveles de ADNmt en suero se realizó por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (Chiu *et al.*, 2003). Para lo cual se utilizaron dos conjuntos de iniciadores específicos para el ARN ribosomal 16S mitocondrial: El primero amplifica un fragmento de 79 pb (ADNmt-79) que representa ADNmt total celular e incluye ADN liberado por las células que sufrieron apoptosis. El segundo amplifica un fragmento de 230 pb (ADNmt-230) que corresponde a ADNmt liberado por procesos de muerte celular no relacionados con apoptosis (necrosis) o secreción activa. La secuencia del iniciador específico sentido para ambos fragmentos de ADNmt es 5'-CAG CCG CTA TTA AAG GTT CG-3'. La secuencia del iniciador antisentido para ADNmt-79 es 5'-CCT GGA TTA CTC CGG TCT GA-3', del iniciador antisentido para ADNmt-230 es de 5'- GGG CTC TGC CAT CTT AAC AA-3'. La qPCR se realizó por duplicado en un equipo de PikoReal (Thermo Scientific). Cada 25 µL de mezcla de reacción contiene: 5 µL de ADN (12.5 ng), 12.5 µL SYBRGreen (Thermo Scientific) y 1 µL de cada iniciador sentido / antisentido (0.3 µM). Cada ensayo incluyó agua como control negativo. La amplificación del gen *GAPDH* fue usado como referencia, para normalizar los valores de Ct usando los siguientes iniciadores, sentido 5'-GAC AGT CAG CCG CAT CTT CT-3' y antisentido 5'-TTA AAA GCA GCC CTG GTG AC-3' (Liu *et al.*, 2015). Las condiciones de la qPCR fueron: 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s, 60°C por 1 min. Para el análisis de la curva de fusión (para confirmar la especificidad de los productos de qPCR) se añadió un ciclo de 60°C a 95°C al final. La cuantificación de los niveles relativos fue calculada usando el método  $\Delta Ct$  como sigue:  $\Delta Ct = \text{media del valor Ct (gen de referencia GAPDH)} - \text{media del valor}$

Ct (de los fragmentos de ADNmt-79 o 230). Los niveles relativos de ADNmt corresponden a los valores de  $2^{\Delta Ct}$ .

### **Detección de los polimorfismos por qPCR**

Los polimorfismos en el gen *SOD2* C47T y A313G en el gen *GSTP1*, fueron determinados utilizando la técnica de PCR en tiempo real, mediante sondas TaqMan empleando el sistema de detección de secuencias QuantStudio 3 (Applied Biosystems). Para la identificación de *SOD2* C47T (ref SNP ID: rs4880), fue utilizado el marcador de ensayo: C\_\_8709053\_10 y para *GSTP1* A313G (ref SNP ID: rs1695): C\_\_3237198\_20. Las mezclas de reacción contenían 0.5 µL del ensayo de genotipado para SNP TaqMan, 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix, y 40 ng de ADN genómico extraído. Las condiciones de ciclaje se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

### **Determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes**

#### *SOD*

La actividad de SOD fue medida en muestras de suero, utilizando el ensayo colorimétrico SOD-WST (Sigma – Aldrich; 19160SOD). El principio del método se basa en la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) por el sistema xantina - xantina oxidasa como un generador del radical superóxido. Para ello se mezclaron 20 µL de suero con, 200 µL de solución de trabajo WST, posteriormente se añadieron 20 µL de solución enzimática de trabajo y se agitó en placa durante 60 seg. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 20 min, la absorbancia fue leída a 450 nm usando un lector de microplacas. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir en un 50% la tasa de reducción del NBT, la actividad de SOD se expresó como U/mL.

#### *GST*

La actividad de glutatión-S-transferasa fue determinada por el método de Habig *et al.*, 1976. Se utilizaron 100 µL de suero, 980 µL de PBS pH 6.5, 10 µL de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) como sustrato y 10 µL de glutatión a una concentración de 0.1 M, la mezcla se incubó durante 5 minutos a 30°C. La absorbancia fue monitoreada durante 5 minutos, las actividades se expresaron en U/mL.

## **Validación de las actividades enzimáticas**

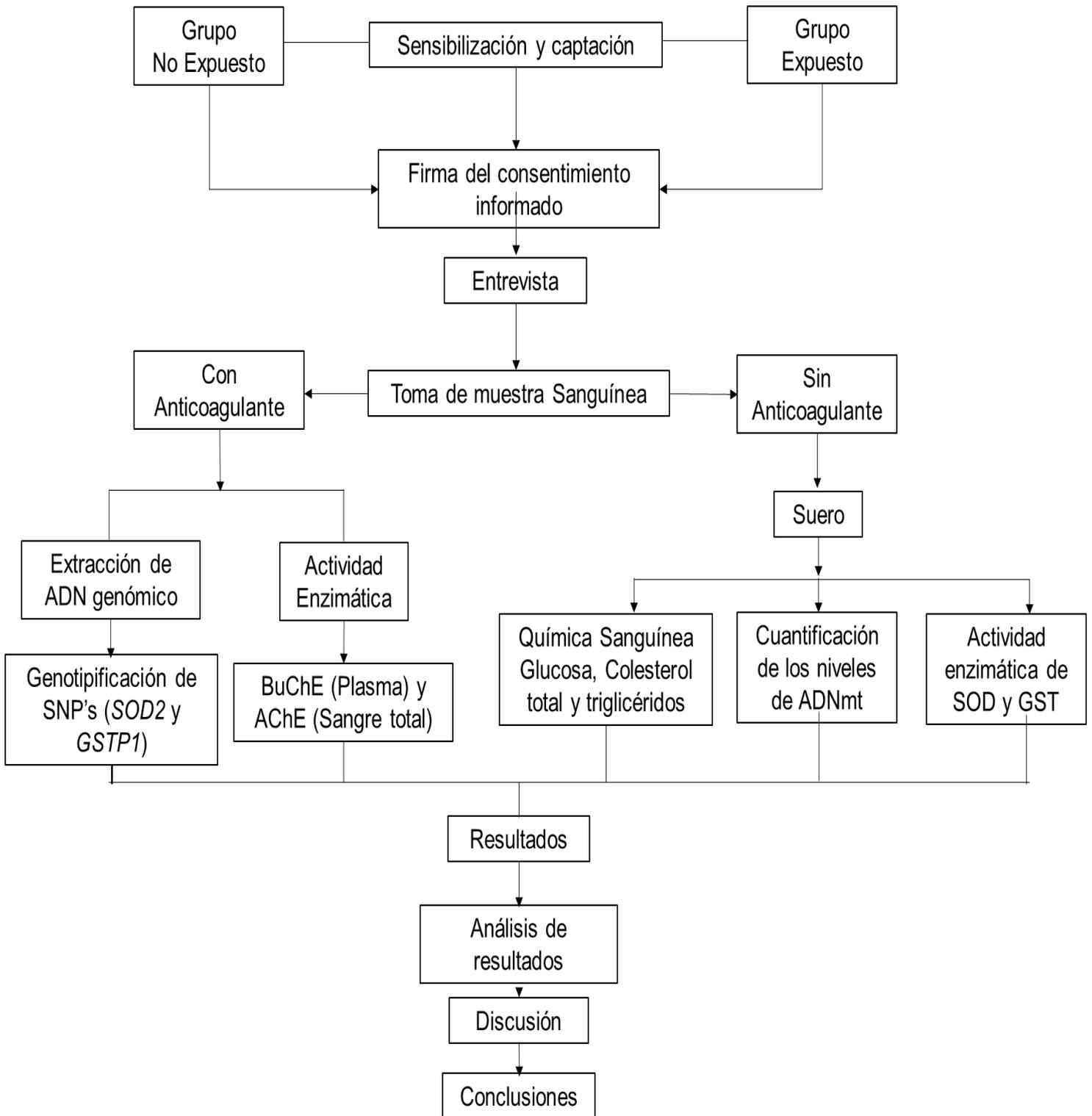
Se evaluó la reproducibilidad de los análisis enzimáticos, para ello cada muestra fue analizada por triplicado excepto la actividad de GST (la cual se realizó por duplicado), en plasma o suero según fuese el caso. Considerando un coeficiente de variación  $\leq 10\%$ . Por lo que las determinaciones que no cumplieron esta reproducibilidad fueron excluidas del análisis.

## **Índice de exposición del grupo expuesto**

Se calculó un índice de exposición utilizando 8 preguntas (categorizadas) de las 11 planteadas para evaluar la exposición a plaguicidas en el cuestionario aplicado (Anexo II), las preguntas que se consideraron son: Años trabajando con plaguicidas, número y tipo de plaguicidas utilizados, periodo de aplicación más reciente, cantidad aplicada, uso y número de material de protección empleado y la presencia de síntomas de intoxicación (esta pregunta fue realizada mencionando un síntoma a la vez). A cada pregunta se le asignó un valor creciente iniciando por la categoría de referencia (Anexo VIII), un puntaje  $< 19$  puntos se consideró exposición moderada y un puntaje  $\geq 19$  puntos exposición alta.

**Análisis estadístico:** Para el análisis de la frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos, la actividad enzimática y los niveles de ADNmt, se utilizaron las pruebas de chi-cuadrada para comparar las proporciones entre grupos. Se calculó la media  $\pm$  desviación estándar de las variables cuantitativas paramétricas y mediana con rango intercuartil, para variables no paramétricas y se analizaron mediante pruebas de t-student, ANOVA, Bonferroni y U-Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Dunn's, respectivamente. Los valores de  $p < 0.05$  fueron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Stata 11.0 y GraphPad Prism 5.0.

## DIAGRAMA DE TRABAJO



## IX. RESULTADOS

La población de estudio está representada por individuos adultos-jóvenes, con una edad promedio de 35 años. El grupo expuesto ocupacionalmente presentó niveles menores de hemoglobina, mientras que los valores de IMC, los niveles de glucosa y triglicéridos fueron mayores. Los hábitos de fumar y consumo de alcohol fueron similares entre los grupos de estudio, mientras que el uso de plaguicidas en casa fue un hábito presente en mayor proporción por los fumigadores (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Características generales de la población de estudio.**

Variable	No expuestos n=56	Expuestos n=49	Total n= 105	<i>p</i>
Edad (años)	32.1 ± 10.9	38.8 ± 11.3	35.2 ± 11.5	<b>0.003*</b>
Hombres	56 (53.3)	49 (46.7)	105 (100)	NS
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.8 ± 4.2	30 ± 5.2	28.8 ± 4.8	<b>0.016*</b>
Glucosa (mg/dL)	73.9 ± 7.2	78.8 ± 9.1	76.2 ± 8.5	<b>0.004*</b>
Colesterol (mg/dL)	153.6 ± 31.1	157 ± 37.1	155.2 ± 33.9	NS
Triglicéridos (mg/dL)	150 ± 83.1	201.4 ± 112.2	172 ± 100.1	<b>0.008*</b>
Hemoglobina (g/dL)	15 ± 0.8	14.5 ± 0.9	14.7 ± 0.9	<b>0.003*</b>
Fumador	13 (23.2)	12 (24.5)	25 (23.8)	NS
Ex – Fumador	14 (25)	12 (24.5)	26 (24.8)	NS
Consumo de alcohol	43 (76.8)	43 (87.8)	86 (81.9)	NS
Casa cerca de cultivos	5 (8.9)	6 (12.2)	11 (10.5)	NS
Uso de plaguicidas en casa	34 (60.7)	42 (85.7)	76 (72.4)	<b>0.004*</b>

Los datos mostrados representan media ± desviación estándar, así como número y (proporciones), los valores de *p* fueron calculados mediante pruebas de t de Student y Chi<sup>2</sup>, \**p* < 0.05, fueron considerados estadísticamente significativos.

### Evaluación de la exposición a plaguicidas

En la evaluación de la exposición a plaguicidas se evidenció que ésta es crónica (8.5 años), la mayoría de los fumigadores reportó una exposición reciente ( $\leq 7$  días) a estos contaminantes y por tiempos prolongados (4.9 horas/día), así como el uso mínimo de equipo de protección. Más del 80% reportó la presencia de síntomas de

intoxicación y una cuarta parte de los fumigadores manifestó haber presentado hasta más de 4 síntomas (Cuadro 2) (Historial de síntomas Anexo VII).

**Cuadro 2. Evaluación de la exposición a plaguicidas y otros parámetros de los fumigadores del Sector Salud.**

Variable	Expuestos n= 49 (%) (Media ± DE)
Años de exposición	8.5 ± 8.4
Fecha última aplicación	
≤ 7 días	25 (51)
> 7 días	24 (49)
Tiempo rociando plaguicidas (Horas/día)	4.9 ± 2
Uso de material de protección	29 (59.2)
Cantidad de material de protección	
1 - 2 equipos	22 (75.9)
3 - 4 equipos	6 (20.7)
≥ 5 equipos	1 (3.4)
Presencia de síntomas de intoxicación	42 (85.7)
Cantidad de síntomas de intoxicación	
≤ 1 Síntoma	18 (36.7)
2 – 3 síntomas	17 (34.7)
4 – 5 Síntomas	6 (12.2)
≥ 6 Síntomas	8 (16.3)

Los fumigadores utilizan diferentes plaguicidas para el control de vectores, éstos fueron ordenados de acuerdo a la frecuencia de uso, siendo los carbamatos los más empleados (46.2%), seguido por los organofosforados (36.7%). De acuerdo al grado de toxicidad definida por la OMS (OMS 2009), el 77.8% se encuentra en la categoría de moderadamente tóxico y el 22.2% en la de ligeramente tóxico, y de acuerdo al tipo de producto se observó que el 88.9% pertenecen al grupo de insecticidas (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Tipos de plaguicidas y frecuencia de uso por los fumigadores.**

Nombre comercial	Grupo químico	Ingrediente activo	Tipo de producto	Toxicidad**	n (%)
Ficam W	Carbamato	Metilcarbamato	Insecticida	II	43 (87.7)
Propoxur	Carbamato	2-isopropoxifenil metilcarbamato	Insecticida	II	30 (61.2)
Clorpirifós	Organofosforado clorado	Clorpirifós	Insecticida	II	24 (49)
Abate	Organofosforado	Temefós	Larvicida	III	20 (40.8)
Malation	Organofosforado	Malation	Insecticida y acaricida	III	14 (28.6)
Aqua Reslin	Piretroide	Permetrina/Esbioaletrina	Insecticida	II	10 (20.4)
Demon WP	Piretroide	Cipermetrina	insecticida	II	6 (12.2)
K- othrine	Piretroide	Deltametrina	insecticida	II	3 (6.1)
DDT	Organoclorado	Dicloro difenil tricloroetano	insecticida	II	3 (6.1)
Otros*					5 ( 10.2)
<b>Bioplaguicida</b>					
SpinosAD	<i>Saccharopolyspora<sup>a</sup> spinosa</i>	Spinosinas A y D	Insecticida	III	9(18.4)
VectoBac	<i>Esporas de Bacillus thuringiensis<sup>a</sup></i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Larvicida	III	13(26.5)

\*Plaguicidas cuya frecuencia es menor del 5%

a) Microorganismos utilizados para el control de plagas

Clasificación de la OMS (2009):

IA=Extremadamente Tóxico

IB= Altamente Tóxico

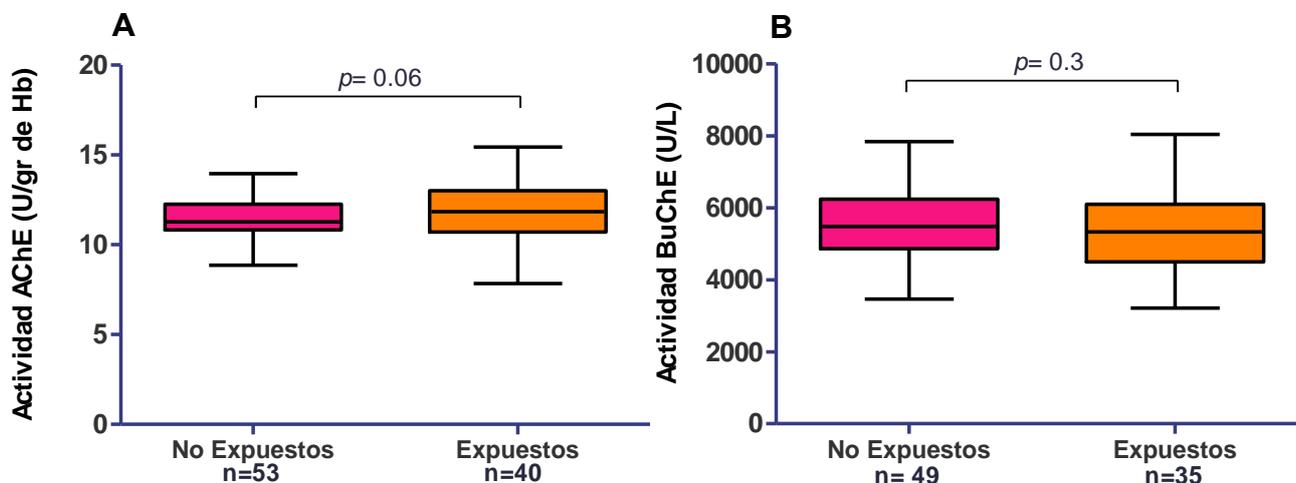
II=Moderadamente Tóxico

III Ligeramente Tóxico

### **Análisis de la actividad enzimática de AChE y BuChE**

La actividad de AChE y BuChE fueron consideradas como marcadores de exposición a plaguicidas inhibidores de colinesterasas para ambos grupos de estudio. En las Figs. 1A (AChE) y 1B (BuChE), se muestran los resultados obtenidos, en donde se aprecia que no hay diferencias significativas en la actividad de ambas enzimas entre los grupos de estudio. El promedio de la actividad de AChE en el grupo de expuestos fue de 11.94 U/gr de Hb contra 11.36 U/gr de Hb para los no expuestos.

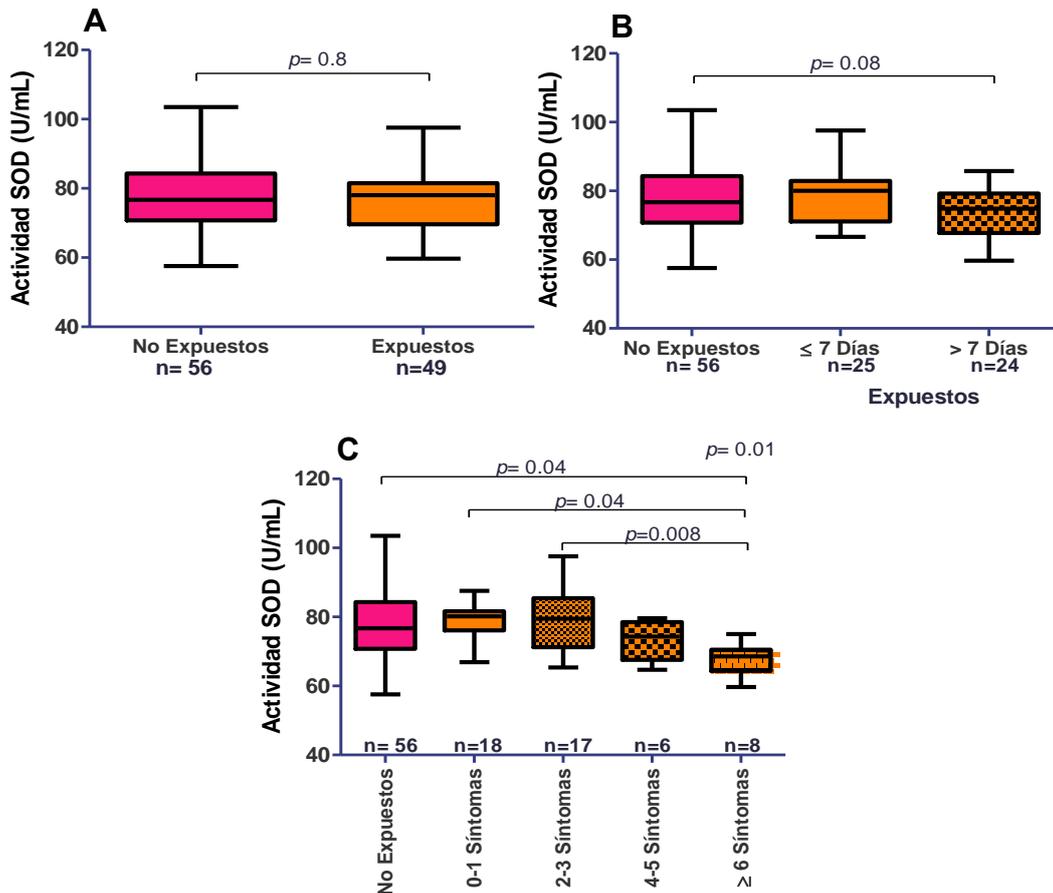
La media de la actividad de BuChE para la población total (expuestos y no expuestos) fue de 5458 U/L considerado como normal para la población mexicana (4620 – 11500 U/L en hombres) (Rojas-García *et al.*, 2011).



**Figura 1.- Comparación de la actividad enzimática de AChE (A) y BuChE (B) entre los grupos de estudio.** La gráfica muestra la media y los valores mínimos y máximos.  $p < 0.05$ .

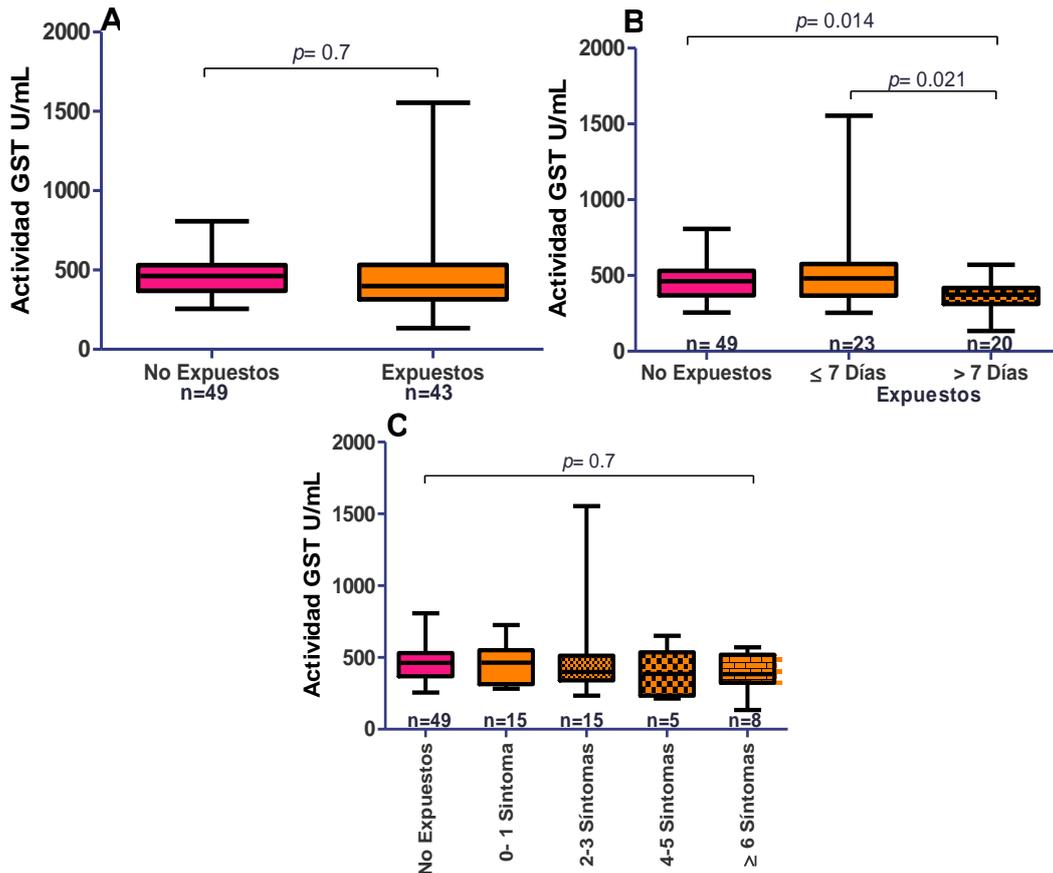
### **Análisis de la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y GST)**

La actividad de SOD fue similar entre los grupos de estudio (76.5 U/mL en los expuestos y 77 U/mL en los no expuestos) (Fig. 2A), sin embargo se observó una mayor actividad de esta enzima en los individuos que reportaron haber aplicado plaguicidas en un periodo menor o igual a 7 días previos a la colecta de la muestra de sangre, en comparación con aquellos trabajadores cuya última exposición fue mayor a un periodo de 7 días (Fig. 2B), así como también se observó que la actividad de SOD disminuyó en relación con la presencia de un mayor número de síntomas, manifestados en periodos previos a la toma de muestra.(Fig. 2C).



**Figura 2. Actividad enzimática de SOD (U/mL).** (A) Comparación entre grupos de estudio (expuestos vs no expuestos). (B) Días transcurridos de la última aplicación de plaguicidas. (C) Síntomas de intoxicación. La gráfica muestra la media y los valores mínimos y máximos. Para comparar la actividad enzimática entre los grupos de estudio, se empleó la prueba t-student (A) y un ANOVA de una vía ajustado por Bonferroni (B y C).  $p < 0.05$ .

Con respecto a la actividad de GST, ésta fue similar entre los grupos de estudio (447.1 en expuestos, contra 458 U/mL en los no expuestos) (Fig. 3A). La actividad de GST fue mayor en aquellos participantes que declararon haber estado expuestos recientemente (Fig. 3B). Con respecto al número de síntomas de intoxicación, no se observó ningún patrón (Fig. 3C).



**Figura 3. Actividad enzimática de GST (U/mL).** (A) Comparación entre grupos de estudio (expuestos vs no expuestos). (B) Días transcurridos de la última aplicación de plaguicidas. (C) Síntomas de intoxicación. La gráfica muestra la media y los valores mínimos y máximos. Para comparar la actividad enzimática entre los grupos de estudio, se empleó la prueba t-student (A) y un ANOVA de una vía ajustado por Bonferroni (B y C).  $p < 0.05$ .

### Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C47T en el gen *SOD2* y A313G en el gen *GSTP1* de la población de estudio.

La identificación de los polimorfismos evaluados se realizó en 103 muestras de ADN<sub>g</sub> de la población de estudio. El alelo de riesgo *SOD2*-47T fue el más frecuente (67.5%) en ambos grupos (expuesto y no expuesto) (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C47T en el gen SOD2 de la población expuesta y no expuesta a plaguicidas.**

Polimorfismo	No expuestos n= 54 (%)	Expuestos n= 49 (%)	Total n= 103 (%)	<i>p</i>
<b>C47T</b>				
<b>Genotipo</b>				
C/C	7 (12.9)	2 (4.1)	9 (8.7)	
C/T	24 (44.4)	25 (51)	49 (47.6)	0.275*
T/T	23 (42.6)	22 (44.9)	45 (43.7)	
<b>Alelo</b>				
C	38 (35.2)	29 (29.6)	67 (32.5)	
T	70 (64.8)	69 (70.4)	139 (67.5)	0.457*

\*Prueba de X<sup>2</sup>

Equilibrio de Hardy-Weinberg, calculado a partir de las frecuencias genotípicas y alélicas del grupo no expuesto (Chi-cuadrada= 0.035, *p*= 0.85).

Así mismo, el alelo de riesgo 313G del polimorfismo A313G en el gen *GSTP1*, fue el más frecuente (63%) para ambos grupos (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo A313G en el gen GSTP1 de la población expuesta y no expuesta a plaguicidas.**

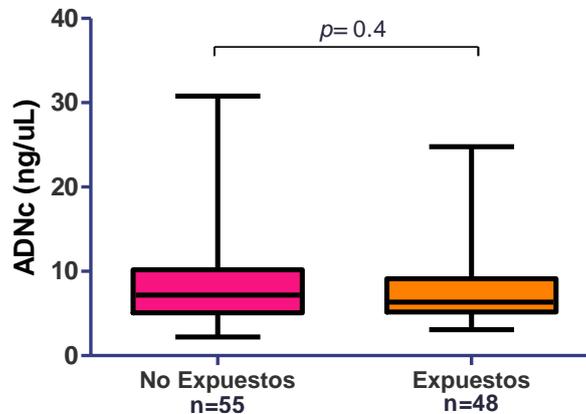
Polimorfismo	No expuestos n= 54 (%)	Expuestos n= 49 (%)	Total n= 103 (%)	<i>P</i>
<b>A313G</b>				
<b>Genotipo</b>				
A/A	10 (18.5)	4 (8.2)	14 (13.6)	
A/G	25 (46.3)	23 (46.9)	48 (46.6)	0.267*
G/G	19 (35.2)	22 (44.9)	41 (39.8)	
<b>Alelo</b>				
A	45 (41.7)	31 (31.6)	76 (37)	
G	63 (58.3)	67 (68.4)	130 (63)	0.15*

\*Prueba de X<sup>2</sup>

Equilibrio de Hardy-Weinberg, calculado a partir de las frecuencias genotípicas y alélicas del grupo no expuesto (Chi-cuadrada= 0.122, *p*= 0.72).

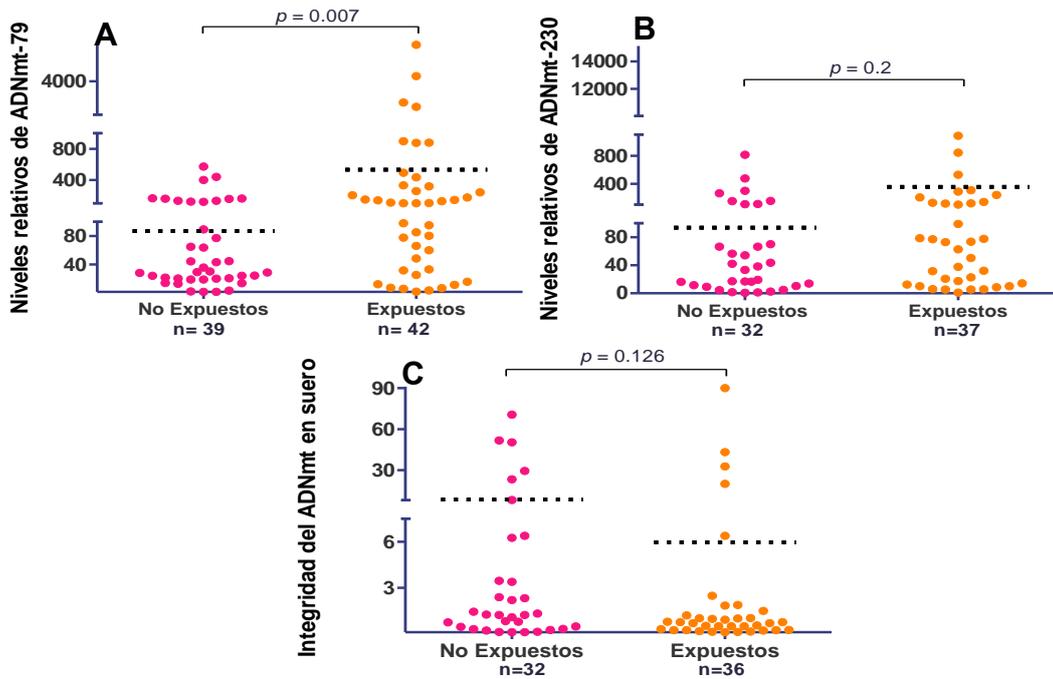
## ADN mitocondrial circulante

En la Fig. 4 se comparan los resultados obtenidos de las concentraciones en suero de ADNc total de las dos poblaciones de estudio, como puede apreciarse, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos expuesto y no expuesto. (7.8 ng/ $\mu$ L vs 8.3 ng/ $\mu$ L, respectivamente).



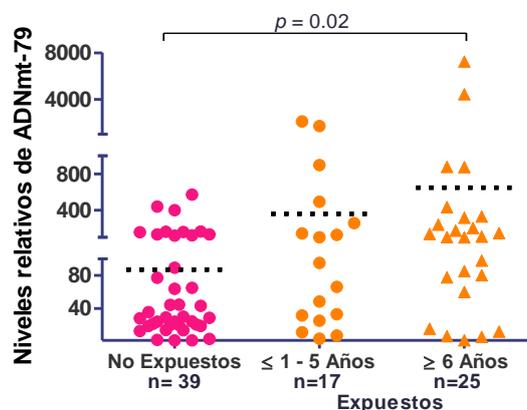
**Figura 4. Comparación de los niveles de ADNc total entre los grupos de estudio.** En la gráfica se muestra la media y los valores mínimos y máximos de los valores de ADNc sérico. Prueba Mann-Whitney.

Con respecto a los niveles de ADNmt circulante, en el grupo de expuestos el nivel fue mayor (1276.3 niveles relativos) en comparación con los niveles encontrados del grupo no expuesto (180.6 niveles relativos); encontrando diferencias significativas, para el fragmento de ADNmt-79 ( $p = 0.007$ ) (Fig. 5A), mientras que, en el fragmento de ADNmt-230 ( $p = 0.2$ ) no mostró diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (73.4 y 36 niveles relativos, respectivamente) (Fig. 5B). La integridad del ADNmt fue evaluada por la relación entre el fragmento de ADNmt-230 y ADNmt-79, para cada grupo de estudio, el resultado mostró una disminución de la integridad del ADNmt en el grupo expuesto (Fig. 5C), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

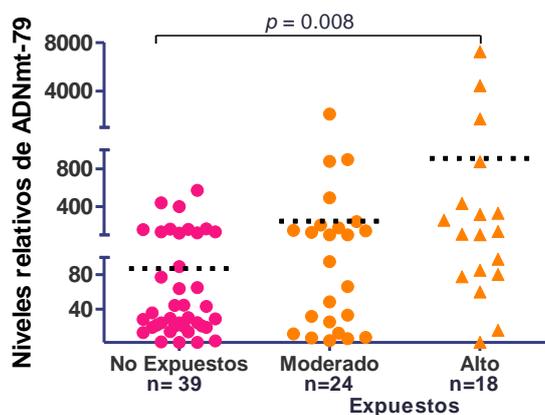


**Figura 5. Comparación de los niveles e integridad del ADNmt entre los grupos de estudio. (A) Los niveles relativos de ADNmt-79. (B) ADNmt-230. (C) la integridad del ADNmt.** La cuantificación relativa del ADNmt fue realizada usando el método  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El gen *GAPDH* fue empleado como gen de referencia. Prueba Mann-Whitney.  $p < 0.05$ .

Cuando se compararon los niveles del fragmento de ADNmt-79, con el tiempo de exposición a plaguicidas (antigüedad en años laborando como fumigador) y con el índice de exposición, éstos fueron superiores en aquellos individuos con un periodo de exposición mayor a 6 años y con un índice de exposición alto, Fig. 6 y 7, respectivamente.

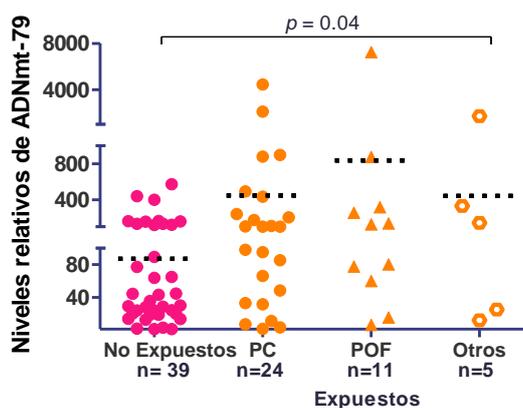


**Figura 6. Comparación de los niveles de ADNmt-79 con los años de exposición.** La cuantificación relativa del ADNmt fue realizada usando el método  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El gen *GAPDH* fue empleado como gen de referencia. Prueba Kruskal-Wallis ajustado por la prueba de comparación múltiple Dunn's.  $p < 0.05$ .

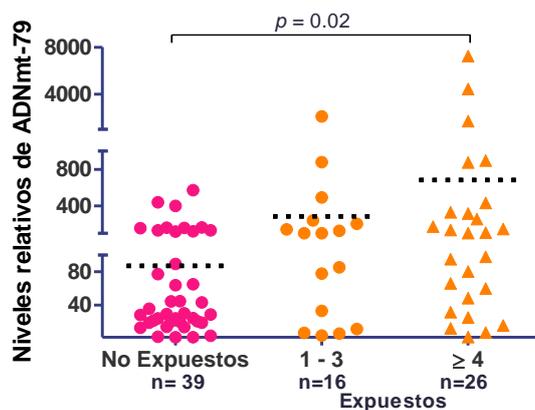


**Figura 7. Comparación de los niveles de ADNmt-79 con el índice de exposición.** Categoría: moderado (< 19 puntos) categoría: Alto ( $\geq 19$  puntos). La cuantificación relativa del ADNmt fue realizada usando el método  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El gen *GAPDH* fue empleado como gen de referencia. Prueba Kruskal-Wallis ajustado por la prueba de comparación múltiple Dunn's.  $p < 0.05$ .

El fragmento de ADNmt-79 mostró también diferencias significativas de acuerdo al tipo de plaguicida empleado ( $p = 0.04$ ) (Fig. 8), y de acuerdo al número de plaguicidas usados ( $p = 0.02$ ) (Fig. 9).

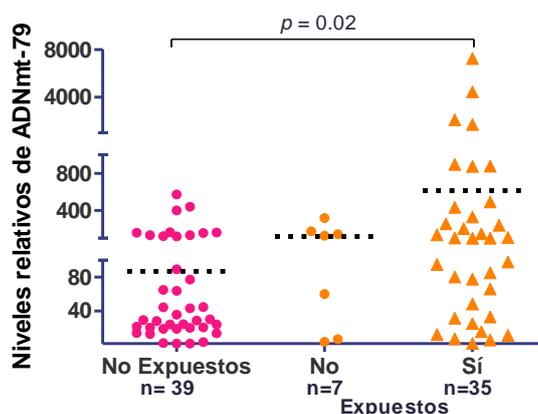


**Figura 8. Relación de los niveles de ADNmt-79 con el último plaguicida utilizado.** PC (plaguicidas carbamatos), POF (plaguicidas organofosforados) y Otros (bioplaguicidas o mezcla de bioplaguicidas y carbamato u organofosforado) La cuantificación relativa del ADNmt fue realizada usando el método  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El gen *GAPDH* fue empleado como gen de referencia. Prueba Kruskal-Wallis ajustado por la prueba de comparación múltiple Dunn's.  $p < 0.05$ .



**Figura 9. Relación del ADNmt-79 con el número de plaguicidas utilizados.** La cuantificación relativa del ADNmt fue realizada usando el método  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El gen *GAPDH* fue empleado como gen de referencia. Prueba Kruskal-Wallis ajustado por la prueba de comparación múltiple Dunn's.  $p < 0.05$ .

Con respecto a los síntomas de envenenamiento el 85.7% de los individuos expuestos, reportaron haber presentado uno o más síntomas de intoxicación por plaguicidas durante la aplicación de éstos (información recabada a través de cuestionarios), observándose una correlación positiva con el incremento en los niveles de ADNmt-79 ( $p = 0.02$ ) (Fig. 10).



**Figura 10. Comparación de los niveles de ADNmt-79 con la presencia de síntomas de intoxicación en el grupo expuesto.** No: no reportó síntomas de intoxicación. Sí: sí reportó síntomas de intoxicación. La cuantificación relativa del ADNmt fue realizada usando el método  $2^{\Delta\Delta Ct}$ . El gen *GAPDH* fue empleado como gen de referencia. Prueba Kruskal-Wallis ajustado por la prueba de comparación múltiple Dunn's.  $p < 0.05$ .

## X. DISCUSIÓN

La exposición ocupacional a plaguicidas de los trabajadores del Sector Salud está influenciada por diferentes factores y variables (campañas de fumigación, duración de la aplicación y tipo de plaguicida entre otros). Reportes en la literatura han demostrado que, dicha exposición puede desencadenar daños a la salud, debido a que por ejemplo, pueden inducir estrés oxidativo. De ahí la importancia de desarrollar, validar e implementar el uso de biomarcadores de susceptibilidad y de efecto, con el objetivo de identificar grupos de riesgo desde etapas tempranas. En este sentido el ADNmt circulante ha sido propuesto como un nuevo biomarcador de efecto, debido a que es un marcador sensible con el que se puede identificar daño inclusive en etapas más tempranas que con el empleo de los biomarcadores tradicionales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los niveles de ADNmt y su relación con la actividad y las variantes polimórficas en los genes de las enzimas antioxidantes en una población con exposición ocupacional y no ocupacional a plaguicidas.

La población de estudio estuvo conformada por individuos cuya antigüedad promedio de exposición a agroquímicos es de 8.5 años. El 59.2% de los participantes usan algún equipo de protección personal al manipular los plaguicidas, resultados similares obtuvo Juárez-Quezada (2015), quien realizó un estudio en 53 fumigadores del sexo masculino, de éstos el 76.6% refirió utilizar material de protección personal, de los cuales el 75.9% utiliza solo de 1 a 2 implementos de seguridad, lo que sigue siendo insuficiente para proteger la salud del trabajador, tal como lo establece la NOM-017-STPS-2017.

Con respecto a la presencia de síntomas de intoxicación aguda o crónica por la exposición a plaguicidas, resultó que el 73.4% de los fumigadores reportaron haber experimentado de 1 a 3 síntomas (irritación de la mucosa, dolor de cabeza e irritación de las vías respiratorias entre otros), estos resultados concuerdan con un estudio de Huamaní-Pacsi *et al.*, (2005), realizado en 83 fumigadores de ambos sexos y quienes registraron que el 56.6% de ellos manifestó la presencia de 1 a 3 síntomas de intoxicación (dolor de cabeza, visión borrosa y vértigo entre otros). Si bien es cierto que se conocen los síntomas de intoxicación crónica y aguda, por la exposición a plaguicidas, éstos pueden verse influenciados por aspectos

bioquímicos y genéticos de cada individuo, como la susceptibilidad, la capacidad de metabolizar estos compuestos químicos, el tiempo y la dosis de exposición, así como el tipo de compuesto empleado, y la frecuencia de uso y el estado clínico de los individuos entre otros (Adad *et al.*, 2015).

Los plaguicidas más utilizados por los fumigadores participantes en el presente estudio, fueron: carbamatos (46.2%) y organofosforados (36.7%), ambos deben su acción tóxica por su efecto anticolinérgico. Estos dos grupos de compuestos químicos, también son empleados frecuentemente para el control de enfermedades transmitidas por vectores (Fernández *et al.*, 2002; Mármol-Maneiro *et al.*, 2003; Huamaní-Pacsi *et al.*, 2005) establecido en la NOM-032-SSA2-2014.

En la población de estudio, la actividad de AChE mostró un valor mínimo de 7.8 y un máximo de 15.4 U/gr de Hb, observándose una ligera diferencia, aunque no estadísticamente significativa entre los dos grupos evaluados ( $p = 0.06$ ); diversos estudios muestran una disminución de los valores de la actividad enzimática de AChE en poblaciones expuestas a POF (Taherdehi *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2013). La disminución de la actividad de AChE en la población expuesta, se ha relacionado con la duración y la frecuencia de exposición a plaguicidas (Castaño *et al.*, 2008), mientras que, en el presente trabajo no fue considerado el periodo de aplicación de plaguicidas, para la recolecta de muestras sanguíneas de los fumigadores, por lo que, la actividad enzimática de AChE no se mostró afectada al momento del análisis. Además, la actividad de esta enzima puede estar influenciada por factores como la cantidad y tipo de plaguicida utilizado durante la aplicación, estos resultados evidencian lo reportado por otros autores (Zepeda-Arce *et al.*, 2017; Bernal-Hernández *et al.*, 2014), donde tampoco se muestra disminuida la actividad de AChE, por ello es importante realizar la evaluación de otras enzimas y biomarcadores que sean más oportunos y sensibles en la detección del daño inducido por la exposición a plaguicidas.

De la misma manera, en este estudio no se encontraron diferencias significativas en la actividad de BuChE en la población evaluada, el 85% de los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos de referencia para la población mexicana (4620 – 11500 U/L en hombres, Rojas-García *et al.*, 2011). Dado el número de factores que pueden modificar la actividad de estas enzimas y que éstas tienen la

capacidad de regenerarse, una estrategia sería que al mismo individuo se le mida la actividad enzimática tanto de AChE como de BuChE justo antes de iniciar su jornada laboral y al término de ésta (en un solo día, o en un periodo de una semana de trabajo), de esta manera cada uno de los fumigadores será su propio control, lo que permitiría evaluar de manera más objetiva, si la actividad de estas enzimas se ve alterada por las tareas desarrolladas.

La medición de la actividad de enzimas antioxidantes durante la exposición a plaguicidas, es utilizada para conocer el efecto de estos compuestos en el sistema antioxidante del organismo. La media de la actividad de SOD para el grupo no expuesto fue de 77 U/mL mientras que para el grupo expuesto fue de 76.5 U/mL. Estos resultados coinciden con lo reportado por Waheed *et al.*, (2017), quienes tampoco observan diferencias al evaluar la actividad de esta enzima en 150 trabajadores con y sin exposición ocupacional a plaguicidas. Se observó una disminución significativa de la actividad de SOD, de acuerdo con el número de síntomas reportados, siendo aquellos que indicaron haber experimentado en alguna ocasión, más de seis síntomas, quienes presentaron la menor actividad enzimática, estos resultados podrían estar relacionados con el riesgo de intoxicación que presentan los fumigadores por no utilizar el equipamiento de protección adecuado.

Con respecto a la actividad de GST, ésta fue menor en el grupo expuesto a plaguicidas (447.1 U/mL), en comparación al grupo no expuesto (458 U/mL), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, al comparar la actividad de GST con el tiempo transcurrido desde la última aplicación de los agroquímicos, se encontraron diferencias significativas en esta actividad, aquellos fumigadores que reportaron que habían estado expuestos en un periodo menor o igual a 7 días previos a la toma de muestra sanguínea, la actividad enzimática fue mayor en comparación con aquellos que manifestaron haber utilizado estos contaminantes hacía más de 7 días ( $p = 0.02$ ). La interpretación de estos resultados sería que, los sistemas antioxidantes se activan como respuesta a una agresión, que en este caso sería la exposición a plaguicidas, y por ello la actividad enzimática de GST se incrementó. Sharma *et al.*, (2013), reportaron un aumento significativo en la actividad enzimática de GST en una población expuesta a plaguicidas organofosforados, organoclorados y piretroides, los autores

comentan que este incremento en la actividad de GST, es parte del proceso de defensa celular, como consecuencia de la inhibición de la actividad de AChE.

Los polimorfismos en los genes que codifican para enzimas antioxidantes son utilizados como biomarcadores de susceptibilidad para poblaciones expuestas a plaguicidas, por lo que en este estudio se evaluó el polimorfismo C47T en el gen *SOD2*, de acuerdo a nuestros resultados, el alelo 47T tiene la mayor prevalencia (67.5%), es importante resaltar que éste está relacionado con una actividad enzimática disminuida. Estos datos son similares a lo reportado por Echart, (2011), quien evaluó en una población mexicana con y sin obesidad, detectando una frecuencia para este alelo del 55%. No obstante la alta prevalencia del alelo de riesgo, en nuestro estudio no se observó asociación alguna entre la presencia de este polimorfismo, y la actividad de SOD o los niveles de ADNmt circulante.

Para el polimorfismo A313G se ha atribuido una mayor actividad enzimática de GSTP1 en los portadores homocigotos (A/A) (Wei *et al.*, 2013). La variante 313G se ha asociado con una baja estabilidad térmica y una actividad catalítica alterada, en respuesta a una variedad de sustratos comparado con la variante 313A. Reportes en la literatura muestran que la actividad de GSTP1 se ve reducida en los heterocigotos (A/G) y disminuida para aquellos con dos copias de G (G/G) (Al-Harras *et al.*, 2016). En nuestro estudio se encontró una mayor prevalencia del alelo 313G (63%), similar a lo obtenido en varios grupos étnicos mexicanos, datos reportados por Juárez-Velázquez *et al.*, (2010), quienes concluyen que la población mexicana tiene una alta frecuencia del alelo 313G comparado con otras poblaciones (caucásica, asiática y negros). En nuestro estudio este polimorfismo no mostró relación con la actividad de GST y el tipo de exposición a los plaguicidas.

En estudios recientes se ha reportado que los insecticidas, herbicidas y acaricidas tienen la capacidad de generar ROS, causando despolarización de la membrana mitocondrial e inhibiendo a los complejos I, II y/o III de la membrana mitocondrial, esto conlleva a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Roubicek y Souza-Pinto, 2017), mediante la liberación de moléculas activadoras como citocromo C y Smac/DIABLO (Holley *et al.*, 2011). Después de que la mitocondria sufre una alteración, diferentes moléculas o componentes celulares son liberados a la circulación general, entre ellos el ADNmt; por lo tanto, se ha postulado que la

presencia de ADNmt circulante es una consecuencia de muerte celular (apoptosis y/o necrosis), así como también se ha relacionado con la activación de la respuesta inmune, es por ello, que éste es considerado como un biomarcador de daño por la exposición a contaminantes ambientales. En nuestro estudio, se cuantificó el fragmento de ADNmt-79, el cual está relacionado con apoptosis y el fragmento de ADNmt-230, que se asocia con necrosis celular, en los dos grupos de estudio. Los resultados mostraron diferencias significativas solo en los niveles de ADNmt-79, entre el grupo expuesto a plaguicidas y el no expuesto. Aunado a lo anterior, la integridad del ADNmt circulante fue determinada como la proporción de fragmentos (ADNmt-230/ADNmt-79), ésta fue menor en el grupo expuesto con respecto al no expuesto, lo que indica que la población que está en contacto con plaguicidas, tiene un mayor proceso apoptótico, al contener una mayor presencia de ADNmt-79. En cambio, el fragmento del ADNmt-230 no mostró relación con la exposición a plaguicidas. Los niveles de ADNmt-79 mostraron una correlación positiva con los años de exposición laboral a los insecticidas y con el índice de exposición (exposición moderada y exposición alta). Estos resultados son similares a lo reportado por Budnik *et al.*, (2013), quienes evaluaron la exposición a haloalcanos, mostrando que los niveles de ADNmt-79 se incrementan con respecto al tiempo de exposición, sugiriendo una asociación entre este fragmento y la exposición crónica a estos contaminantes. Aún es difícil de comprender, el por qué se detectan niveles altos de ADNmt circulante, no así para el caso de los fragmentos cortos, ya que hay suficiente evidencia que sugiere una asociación entre los niveles altos de estos y la muerte celular por apoptosis, en individuos expuestos a plaguicidas. Aunado a lo anterior, los niveles altos de ADNmt-79 en circulación, también se han relacionado con la activación de procesos inflamatorios, los cuales inducen procesos de muerte celular programada, esto sería un argumento más, del por qué se incrementa la apoptosis (Fang *et al.*, 2016).

De acuerdo con el tipo de plaguicida utilizado en la aplicación más reciente, se observaron los niveles más altos de ADNmt-79 en aquellos trabajadores que emplearon aquellos del grupo de carbamatos y organofosforados, es importante resaltar que reportes en la literatura, han evidenciado que estos plaguicidas inducen estrés oxidativo y muerte celular por apoptosis (Burns *et al.*, 2013). El historial de exposición referido como el número de plaguicidas utilizados durante la vida laboral

y la presencia de síntomas de intoxicación, también mostraron una correlación positiva con los niveles circulantes del ADNmt-79, éstos fueron mayores en los individuos que expresaron haber tenido signos de envenenamiento, en comparación con aquellos que no los presentaron o con el grupo no expuesto. Los niveles de ADNmt circulante no se relacionaron con el IMC, la edad o con el consumo de alcohol o cigarro en ambas poblaciones de estudio.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, sugieren que el establecer estrategias para el buen uso y manejo de plaguicidas, el empleo de equipo de protección adecuado y la adquisición de buenos hábitos alimenticios en la población ocupacionalmente expuesta a estos contaminantes, podría disminuir el riesgo de adquirir patologías asociadas a esta exposición, al evitar y/o disminuir los niveles altos de ADNmt-79 circulantes, dado a que éstos estuvieron relacionados con variables como los años de trabajo laboral con plaguicidas, tipo y número de estos compuestos utilizados y la presencia de síntomas de intoxicación. Finalmente, estos resultados apoyan lo reportado por otros autores que proponen utilizar al ADNmt como un biomarcador de efecto temprano, por la exposición a plaguicidas.

## **XI. CONCLUSIONES**

- Las actividades enzimáticas de (AChE y BuChE) consideradas como biomarcadores de exposición a plaguicidas no mostraron diferencias significativas entre los grupos de estudio, debido probablemente a la capacidad de regeneración de éstas, por lo que es conveniente coleccionar la muestra sanguínea justo al término de la jornada laboral.
- La actividad de GST no mostró cambios significativos en fumigadores expuestos a plaguicidas, aunque sí hubo una asociación con el tiempo transcurrido con la última aplicación. La actividad de SOD se encontró disminuida en fumigadores que refirieron haber experimentado más de 6 síntomas de intoxicación.
- Los polimorfismos C47T y A313G mostraron una alta frecuencia de los alelos asociados con riesgo de daño oxidativo, en esta población, pero no correlacionaron con ninguna de las variables evaluadas (actividades enzimáticas, exposición a plaguicidas y los niveles de ADNmt circulante).

- Los niveles relativos del fragmento de ADNmt-79 mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio y los niveles circulantes de éste correlacionaron positivamente con los años de exposición, índice de exposición, el tipo y número de plaguicidas utilizados, y la presencia de síntomas de intoxicación, no así con la actividad enzimática antioxidante, ni con los polimorfismos en los genes *SOD2* y *GSTP1* de estas enzimas.
- Los niveles relativos del fragmento de ADNmt-230 no mostró diferencias significativas entre los grupos de estudio, así como tampoco no hubo una asociación con la actividad y los polimorfismos en los genes *SOD2* y *GSTP1* o la exposición a plaguicidas.

## **XII. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS**

- Evaluar la actividad y el polimorfismo de la misma enzima antioxidante antes y después de la jornada laboral.
- Cuantificar las concentraciones de plaguicidas en la población de estudio.
- Determinar el estrés oxidativo, para analizar su asociación con los niveles de las enzimas antioxidantes y ADNmt circulante.
- Incluir el análisis de marcadores de inflamación como citocinas inflamatorias, para conocer la relación del ADNmt circulante y la activación de procesos inflamatorios.
- Los resultados obtenidos de los niveles relativos del fragmento de ADNmt-79, podrían permitir establecer programas de monitoreo para los fumigadores del Sector Salud, logrando identificar a aquellos individuos con mayor riesgo laboral.

## ANEXOS

### Anexo I. Consentimiento informado



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
**Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental**

Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. C.P. 39070 Teléfono y Fax (01747) 47 25503

Página web [www.uacqb-guerrero.org.mx](http://www.uacqb-guerrero.org.mx) Tel. 01 747 4716746



No. de Folio 

--	--	--	--	--	--	--	--

FECHA:

HORA:

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### PROYECTO: ACTIVIDAD Y POLIMORFISMOS EN SOD Y GST Y SU RELACIÓN CON ADNmt EN FUMIGADORES

Mediante este documento se le informa la naturaleza de este estudio de investigación toxicológica y cómo será su participación, para que una vez que se haya resuelto todas sus dudas, pueda de manera libre incluirse en el estudio. Al firmar este documento, doy mi consentimiento para que me entreviste un miembro del personal del Laboratorio de Toxicología y Salud ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, ubicada en Av. Lázaro Cárdenas S/N, Chilpancingo, Gro. Entiendo que la entrevista aportará información útil para interpretar los resultados que se obtengan en los exámenes de laboratorio que se me practicarán y también formará parte de los resultados de un proyecto de Investigación.

Entiendo que seré entrevistado, en los horarios que se me indiquen o que así convengan, se me harán unas preguntas familiares, personales y de salud. Entiendo que se me tomará una muestra de sangre por punción venosa para los estudios de laboratorio. La entrevista durará entre 10 y 20 minutos, también estoy enterado que el entrevistador (a) puede ponerse en contacto conmigo en el futuro, a fin de obtener más información. Fui elegido para participar en este proyecto debido a que cubría todas las características evaluadas. Se me ha dicho que las respuestas a mis preguntas y demás información obtenida no serán reveladas a nadie y que en ningún informe de este estudio se me identificará jamás en forma alguna. Como compensación por cualquier esfuerzo o molestia relacionados con mi participación en este estudio me serán proporcionados los resultados de los análisis (Química sanguínea y Biometría hemática) sin costo alguno.

Entiendo que en caso de que tenga alguna pregunta acerca del estudio o sobre mis derechos como participante, debo buscar al Dr. Gerardo Huerta Beristaín, en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro. Teléfono: 747-498-08-59.

Me han explicado que mi participación es voluntaria, que no tiene costo alguno y que puedo retirarme en el momento que así lo decida, sin dar explicación alguna y con derecho a recibir los resultados de los análisis que se me hayan practicado.

---

Nombre y Firma del participante

---

Nombre y Firma del entrevistador (a)

---

Nombre y Firma de Testigo 1

---

Nombre y Firma de Testigo 2

## Anexo II. Encuesta (Expuestos)



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

### Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental

Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. C.P. 39070 Teléfono y Fax (01747) 47 25503



### ACTIVIDAD Y POLIMORFISMOS DE SOD Y GST Y SU RELACIÓN CON ADNmt EN FUMIGADORES

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ No. Folio: \_\_\_\_\_

Tipo de participante: Caso

#### I. DATOS GENERALES

Nombre: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: años \_\_\_\_\_ meses \_\_\_\_\_

Presión arterial: Sistólica \_\_\_\_\_ Diastólica \_\_\_\_\_

Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Dirección de residencia actual (Calle y Colonia): \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Años de residencia: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Si el tiempo de residencia es menor a 5 años, escriba su dirección anterior

Calle y colonia \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Talla: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Lugar de origen: Padre: \_\_\_\_\_

Madre: \_\_\_\_\_

Abuelos paternos:

\_\_\_\_\_ Padre \_\_\_\_\_ Madre

Abuelos maternos:

\_\_\_\_\_ Padre \_\_\_\_\_ Madre

## II. CUESTIONARIO SOCIODEMOGRÁFICO

1.- ¿A qué institución de salud está afiliado?

a) ISSSTE      b) Seguro popular      c) IMSS      d) Privado

2.- ¿Cuál es su ocupación u oficio? \_\_\_\_\_

3.- ¿Cuánto gana quincenalmente? \_\_\_\_\_

4.- ¿Cuántas personas dependen económicamente de este ingreso?

No. De personas: \_\_\_\_\_

5.- ¿Habla usted alguna lengua indígena (por ejemplo: tlapaneco, mixteco, náhuatl, etc.)?

Si    ¿Cuál? \_\_\_\_\_

No

6.- ¿Qué grado de estudios tiene?

Primaria

Secundaria

Preparatoria o carrera técnica

Licenciatura

Estudios incompletos de: \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_

7.- La casa donde vive es:

a) Rentada      b) Propia      c) Otro

8.- ¿Con que servicios cuenta su casa?

a) Agua      b) Baño o letrina      c) Luz      d) Drenaje

9.- ¿De qué material es la vivienda?

Cemento

Madera

Adobe

Lámina de cartón

Lamina de metal

10.- ¿De qué material es el techo de la vivienda?

Lámina de cartón

Lámina metálica

Lámina de asbesto

Teja

Concreto

11.- ¿De qué material es el piso de la vivienda?

Madera

Tierra

Cemento o firme

Mosaico, u otro tipo de recubrimiento, especifique: \_\_\_\_\_

12.- ¿Cuántos cuartos tienen su vivienda? Incluyendo baño, sala/comedor, cocina.

¿Cuántos focos tiene en su casa? \_\_\_\_\_

13.- ¿Qué tipo de baño tiene?

Al aire libre

Letrina seca

Fosa séptica

Baño con drenaje

14.- ¿Dónde acostumbran cocinar?

En una habitación donde se convive o se duerme

Una habitación independiente utilizada como cocina

Al aire libre

15.- ¿Cuál es el combustible que utiliza para cocinar?

Leña, Carbón o madera

Residuos agrícolas o de cultivo (rastrojo)

Electricidad

Gas

Otro (especifique): \_\_\_\_\_

16.- ¿El agua que consume para beber es?

Agua potable

Agua de pozo

Agua de lluvia (en depósito o cisterna)

Agua de arroyo, manantial u ojos de agua

### III. CUESTIONARIO CONSUMO DE ALCOHOL

1.- ¿Usted consume alcohol actualmente (cerveza, mezcal, vino, etc.)?

Si

No

2.- Si la respuesta es sí ¿Cuántos vasos de alcohol bebe en un día normal? (Como una unidad de alcohol tome en cuenta; una lata de cerveza, un vaso de vino, una copa de licor). Número de unidades por día: \_\_\_\_\_

3.- Si la respuesta es que ha dejado de consumirlo. ¿Hace cuánto tiempo? \_\_\_\_\_

4.- ¿Cuántos días a la semana consume alcohol?

Días por semana: \_\_\_\_\_

5.- ¿Qué tipo de alcohol consume?

Mezcal

Cerveza

Alcohol puro

Otro: \_\_\_\_\_

### IV. CUESTIONARIO DE TABAQUISMO

1.- ¿Actualmente es fumador? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Nunca ha fumado \_\_\_\_\_

2.- Si la respuesta es sí ¿Desde cuándo comenzó a fumar? \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (Mes y año)

3.- Si es, ex – Fumador Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Desde cuándo: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (Mes y año)

4.- ¿Durante cuánto tiempo fue fumador? \_\_\_\_\_

5.- ¿Cuántos cigarrillos consume al día? \_\_\_\_\_

6.- ¿Convive frecuentemente con personas fumadoras?

Si

No

### V. CUESTIONARIO OCUPACIÓN Y SALUD

1.- Ocupación u oficio: \_\_\_\_\_ Tiempo: \_\_\_\_\_

Si el tiempo que tiene es menor a cinco años, señale a qué se dedicaba previamente y por cuánto tiempo.

2.- ¿Actividad anterior? \_\_\_\_\_ ¿Tiempo? \_\_\_\_\_

3.- ¿Su vivienda está cerca de una parcela?

Si \_\_\_\_\_ ¿A qué distancia? \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

4.- ¿En su casa se aplican insecticidas?

Si \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

No

5.- ¿De qué tipo? \_\_\_\_\_

6.- ¿Quién los aplica? \_\_\_\_\_

7.- ¿Cuándo fue la última vez que lo aplicaron? \_\_\_\_\_

## VI. CUESTIONARIO DE USO DE PLAGUICIDAS

1.- ¿Cuántos años tiene aplicando (rociando) plaguicidas?

Años: \_\_\_\_\_ Meses: \_\_\_\_\_

2.- ¿Qué tipo de plaguicidas ha aplicado? \_\_\_\_\_

Los aplica en:

- ( ) Parcela propia o rentada  
 ( ) Para el control de enfermedades transmitidas por vectores (como trabajador de la SSA)  
 ( ) Casas, jardines, hospitales, escuelas (como empleado o propietario de un negocio)

3.- ¿Cuándo fue la última aplicación de plaguicidas que realizó? Fecha \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

¿Y qué tipo de plaguicida aplicó? \_\_\_\_\_

4.- ¿Cuál fue la duración de su última aplicación? Días\_\_\_ Horas\_\_\_ Minutos\_\_\_

¿Y cuál fue la dosis aplicada? \_\_\_\_\_

5.- ¿De cuántas horas es su jornada laboral? \_\_\_\_\_ ¿Y cuántas de ellas está aplicando plaguicidas? \_\_\_\_\_

7.- ¿Cuándo utiliza estos productos, usa alguna protección? (guantes, mascarilla, ropa especial, etc.)

Si

No

8.- Si la respuesta fue si, ¿Qué tipo de protección usa?

- ( ) Guantes  
 ( ) Mascarilla  
 ( ) Overol  
 ( ) Botas especiales  
 ( ) Gafas

Otro: \_\_\_\_\_

¿Utiliza ropa especial para aplicar los plaguicidas o es la misma que la de uso diario?

9.- ¿Qué tratamiento da a su ropa para lavarla después de aplicar el plaguicida?

10.- ¿Ha presentado alguna manifestación de intoxicación durante y/o después de la fumigación de los plaguicidas?

Si

No

11.- ¿Cuántas veces tuvo los siguientes síntomas ocurridos durante o después del trabajo en los últimos 12 meses?

Síntomas/Incidencia	Casi siempre	Frecuentemente	Esporádico	Casi nunca	Nunca	¿Cuándo ocurrió por primera vez?
Dolor de cabeza						
Mareo						
Irritación de las vías respiratorias/ Tos						
Dificultad para respirar						
Irritación de la mucosa (Picor ocular, rinitis, estomatitis)						
Irritación de la piel						
Náusea						
Calambres						
Trastornos de concentración						
Diarrea, calambres abdominales						
Debilidad, fatiga						
Convulsiones						
Alteración de la memoria						
Opresión en el pecho, disnea						
Inestabilidad emocional						
Trastornos del habla						
Desorden del sueño						
Trastornos del equilibrio, caminar desequilibrado						

Temblores						
Pérdida del apetito						

12.- ¿Padece alguna de las siguientes enfermedades? :

- Artritis\_\_\_\_\_
- Enfermedad reumática\_\_\_\_\_
- Asma\_\_\_\_\_
- Cáncer\_\_\_\_\_
- Diabetes\_\_\_\_\_
- Enfermedad del riñón\_\_\_\_\_
- Enfermedad del hígado\_\_\_\_\_
- Enfermedad de Parkinson\_\_\_\_\_
- Nerviosismo\_\_\_\_\_
- Ansiedad\_\_\_\_\_
- Epilepsia\_\_\_\_\_
- Otra condición crónica\_\_\_\_\_

13.- ¿Desde hace cuánto tiempo la padece?

\_\_\_\_\_

14.- ¿Sigue algún tratamiento?

- Si
- No

15.- ¿Qué medicamentos toma? \_\_\_\_\_

¿Cuál? \_\_\_\_\_ ¿Hoy lo consumió? \_\_\_\_\_

16.- ¿Toma algún otro medicamento adicional?

## VII. CUESTIONARIO COMPLEMENTARIO DE NUTRICIÓN

1.- ¿Consume frutas y verduras?

- Si
- No

2.- ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

3.- Indique ¿Cuántas porciones consume en días a la semana?:

Carnes: \_\_\_\_\_

Lácteos: \_\_\_\_\_

Fruta: \_\_\_\_\_

Verdura: \_\_\_\_\_

Cereales: \_\_\_\_\_

4.- ¿Consume vitamínicos y/o suplementos?

- Si
- No

5.- ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

6.- ¿Usted consume frecuentemente los siguientes alimentos? (≥ a 3 veces por semana)

Arándanos

Granada

Fresa

7.- ¿Tiene alguna dieta especial o tratamiento para bajar de peso? ¿En qué consiste?

- Si
- No

Dieta: \_\_\_\_\_

Tratamiento: \_\_\_\_\_

8.- ¿Realiza ejercicio?

- Si
- No

9.- ¿Cuántas horas al día?: \_\_\_\_\_

10.- ¿Qué tipo de ejercicio realiza? \_\_\_\_\_

## VIII. ANTECEDENTES FAMILIARES

1.- ¿Su papá vive?

Si

¿Presenta alguna enfermedad? \_\_\_\_\_

No Por enfermedad: \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

2.- ¿Su mamá vive?

Si ¿Presenta alguna enfermedad? \_\_\_\_\_

No Por enfermedad: \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

3. ¿Alguno de sus hermanos, hermanas o familiar cercano padece alguna enfermedad actualmente? \_\_\_\_\_ ¿Quién? \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

4.- ¿Antecedentes familiares de diabetes?

Si

No

Parentesco: \_\_\_\_\_

5.- ¿Antecedentes familiares de Cáncer?

Si

No

¿De qué tipo? \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

**Medidas antropométricas:**

Circunferencia de cintura:

Circunferencia de cadera:

Circunferencia de brazo:

Circunferencia de muñeca:

Anexo III. Encuesta (No expuestos)



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
*Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental*

Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria, Chilpancingo, Gro. C.P. 39070 Teléfono y Fax (01747) 47 25503



**ACTIVIDAD Y POLIMORFISMOS DE SOD Y GST Y SU RELACIÓN CON ADNmt EN FUMIGADORES**

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ No. Folio: \_\_\_\_\_

Tipo de participante: No expuesto

**I. DATOS GENERALES**

Nombre: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Edad: años \_\_\_\_\_ meses \_\_\_\_\_

Presión arterial: Sistólica \_\_\_\_\_ Diastólica \_\_\_\_\_

Lugar de Nacimiento: \_\_\_\_\_

Dirección de residencia actual (Calle y Colonia): \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Años de residencia: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Si el tiempo de residencia es menor a 5 años, escriba su dirección anterior

Calle y colonia \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Talla: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_

Lugar de origen: Padre: \_\_\_\_\_

Madre: \_\_\_\_\_

Abuelos paternos:

\_\_\_\_\_ Padre \_\_\_\_\_ Madre

Abuelos maternos:

\_\_\_\_\_ Padre \_\_\_\_\_ Madre

## II. CUESTIONARIO SOCIODEMOGRÁFICO

1.- ¿A qué institución de salud está afiliado?

a) ISSSTE      b) Seguro popular      c) IMSS      d) Privado

2.- ¿Cuánto gana quincenalmente? \_\_\_\_\_

3.- ¿Cuántas personas dependen económicamente de este ingreso?

No. De personas: \_\_\_\_\_

4.- ¿Habla usted alguna lengua indígena (por ejemplo: tlapaneco, mixteco, náhuatl, etc.)?

Si    ¿Cuál? \_\_\_\_\_

No

5.- ¿Qué grado de estudios tiene?

Primaria

Secundaria

Preparatoria o carrera técnica

Licenciatura

Estudios incompletos de: \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_

6.- La casa donde vive es:

a) Rentada      b) Propia      c) Otro

7.- ¿Con que servicios cuenta su casa?

a) Agua      b) Baño o letrina      c) Luz      d) Drenaje

8.- ¿De qué material es la vivienda?

Cemento

Madera

Adobe

Lámina de cartón

Lamina de metal

9.- ¿De qué material es el techo de la vivienda?

Lámina de cartón

Lámina metálica

Lámina de asbesto

Teja

Concreto

10.- ¿De qué material es el piso de la vivienda?

Madera

Tierra

Cemento o firme

Mosaico, u otro tipo de recubrimiento, especifique: \_\_\_\_\_

11.- ¿Cuántos cuartos tienen su vivienda? Incluyendo baño, sala/comedor, cocina.

¿Cuántos focos tiene en su casa? \_\_\_\_\_

12.- ¿Qué tipo de baño tiene?

Al aire libre

Letrina seca

Fosa séptica

Baño con drenaje

13.- ¿Dónde acostumbran cocinar?

En una habitación donde se convive o se duerme

Una habitación independiente utilizada como cocina

Al aire libre

14.- ¿Cuál es el combustible que utiliza para cocinar?

Leña, Carbón o madera  
Residuos agrícolas o de cultivo (rastrojo)  
Electricidad  
Gas  
Otro (especifique): \_\_\_\_\_  
15.- ¿El agua que consume para beber es?

Agua potable  
Agua de pozo  
Agua de lluvia (en depósito o cisterna)  
Agua de arroyo, manantial u ojos de agua

### III. CUESTIONARIO ALCOHOL

1.- ¿Usted consume alcohol actualmente (cerveza, mezcal, vino, etc.)?

Si  
No

2.- Si la respuesta es sí ¿Cuántos vasos de alcohol bebe en un día normal? (Como una unidad de alcohol tome en cuenta; una lata de cerveza, un vaso de vino, una copa de licor). Número de unidades por día: \_\_\_\_\_

3.- Si la respuesta es que ha dejado de consumirlo. ¿Hace cuánto tiempo? \_\_\_\_\_

4.- ¿Cuántos días a la semana consume alcohol?

Días por semana: \_\_\_\_\_

5.- ¿Qué tipo de alcohol consume?

Mezcal  
Cerveza  
Alcohol puro  
Otro: \_\_\_\_\_

### IV. CUESTIONARIO TABAQUISMO

1.- ¿Actualmente es fumador? Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Nunca ha fumado \_\_\_\_\_

2.- Si la respuesta es sí ¿Desde cuándo comenzó a fumar? \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (Mes y año)

3.- Si es, ex – Fumador Si \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_ Desde cuándo: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (Mes y año)

4.- ¿Durante cuánto tiempo fue fumador? \_\_\_\_\_

5.- ¿Cuántos cigarrillos consume al día? \_\_\_\_\_

6.- ¿Convive frecuentemente con personas fumadoras?

Si  
No

### V. CUESTIONARIO OCUPACIÓN Y SALUD

1.- Ocupación u oficio: \_\_\_\_\_

2.- ¿Tiempo que tiene en esta actividad? \_\_\_\_\_

Si el tiempo que tiene es menor a cinco años, señale a qué se dedicaba previamente y por cuánto tiempo.

3.- ¿Actividad anterior? \_\_\_\_\_ ¿Tiempo? \_\_\_\_\_

4.- ¿En su trabajo maneja sustancias tóxicas como solventes, plaguicidas?

Si \_\_\_\_\_ Especifique: \_\_\_\_\_  
No \_\_\_\_\_

5.- ¿Su vivienda está cerca de una parcela?

Si \_\_\_\_\_ ¿A qué distancia? \_\_\_\_\_ No \_\_\_\_\_

6.- ¿En su casa se aplican insecticidas?

Si \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_  
No \_\_\_\_\_

7.- ¿De qué tipo? \_\_\_\_\_

8.- ¿Quién los aplica? \_\_\_\_\_

9.- ¿Cuándo fue la última vez que lo aplicaron? \_\_\_\_\_

10.- ¿Alguna vez ha tenido una experiencia de intoxicación por plaguicidas o cualquier otra sustancia?

Si \_\_\_\_\_ Especifique: \_\_\_\_\_

No

11.- ¿Padece alguna de las siguientes enfermedades? :

Artritis\_\_\_\_\_

Enfermedad reumática\_\_\_\_\_

Asma\_\_\_\_\_

Cáncer\_\_\_\_\_

Diabetes\_\_\_\_\_

Enfermedad del riñón\_\_\_\_\_

Enfermedad del hígado\_\_\_\_\_

Enfermedad de Parkinson\_\_\_\_\_

Nerviosismo\_\_\_\_\_

Ansiedad\_\_\_\_\_

Epilepsia \_\_\_\_\_

Otra condición crónica\_\_\_\_\_

12.- ¿Desde hace cuánto tiempo la padece?

13.- ¿Sigue algún tratamiento?

Si

No

14.- ¿Qué medicamentos toma? \_\_\_\_\_

¿Cuál? \_\_\_\_\_ ¿Hoy lo consumió? \_\_\_\_\_

15.- ¿Toma algún otro medicamento adicional?

## VI. CUESTIONARIO COMPLEMENTARIO DE NUTRICIÓN

1.- ¿Consumes frutas y verduras?

Si

No

2.- ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

3.- Indique ¿Cuántas porciones consume en días a la semana?:

Carnes: \_\_\_\_\_

Lácteos: \_\_\_\_\_

Fruta: \_\_\_\_\_

Verdura: \_\_\_\_\_

Cereales: \_\_\_\_\_

4.- ¿Consumes vitamínicos y/o suplementos?

Si

No

5.- ¿Cuáles? \_\_\_\_\_

6.- ¿Usted consume frecuentemente los siguientes alimentos? (≥ a 3 veces por semana)

Arándanos

Granada

Fresa

7.- ¿Tiene alguna dieta especial o tratamiento para bajar de peso? ¿En qué consiste?

Si

No

Dieta: \_\_\_\_\_

Tratamiento: \_\_\_\_\_

8.- ¿Realiza ejercicio?

Si

No

9.- ¿Cuántas horas al día?: \_\_\_\_\_

10.- ¿Qué tipo de ejercicio realiza? \_\_\_\_\_

## VII. ANTECEDENTES FAMILIARES

1.- ¿Su papá vive?

Si

No

¿Presenta alguna enfermedad? \_\_\_\_\_

Por enfermedad: \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

2.- ¿Su mamá vive?

Si

¿Presenta alguna enfermedad? \_\_\_\_\_

No Por enfermedad: \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

3. ¿Alguno de sus hermanos, hermanas o familiar cercano padece alguna enfermedad actualmente? \_\_\_\_\_ ¿Quién? \_\_\_\_\_ ¿Cuál? \_\_\_\_\_

4.- ¿Antecedentes familiares de diabetes?

Si

No

Parentesco: \_\_\_\_\_

5.- ¿Antecedentes familiares de Cáncer?

Si

No

¿De qué tipo? \_\_\_\_\_

Parentesco: \_\_\_\_\_

**Medidas antropométricas:**

Circunferencia de cintura:

Circunferencia de cadera:

Circunferencia de brazo:

Circunferencia de muñeca:

**Anexo IV. Purificación de ADN a partir de sangre o fluidos corporales** (Protocolo de centrifugación).

**Procedimiento**

1. Pipetear 20 µL proteasa QIAGEN (o proteinasa K) en el fondo de un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
2. Añadir 200 µL de muestra al tubo de microcentrífuga. Utilice un máximo de 200 µL de sangre entera, plasma, suero, capa leucocitaria, o fluidos corporales, o hasta  $5 \times 10^6$  linfocitos en 200 µL de PBS.
3. Añadir 200 µL de buffer AL a la muestra. Mezcle en un vórtex durante 15 s. Para asegurar la lisis eficiente, es esencial que la muestra y buffer AL se mezclan a fondo para obtener una solución homogénea.
4. Incubar a 56 ° C durante 10 min. Rendimiento de ADN alcanza un máximo después de la lisis durante 10 minutos a 56 ° C. Tiempos de incubación más largos no tienen ningún efecto sobre el rendimiento o la calidad del ADN purificado.
5. Centrifugar brevemente el tubo de microcentrífuga de 1,5 mL para retirar las gotas desde el interior de la tapa.
6. Añadir 200 µL de etanol (96-100%) a la muestra, y mezclar de nuevo por un vórtex durante 15 s. Después de mezclar, centrifugar brevemente el tubo de microcentrífuga de 1,5 mL para retirar las gotas desde el interior de la tapa. Si el volumen de la muestra es mayor que 200 µL, aumentar la cantidad de etanol proporcionalmente; por ejemplo, una muestra de 400 µL requerirá 400 µL de etanol.
7. Aplique con cuidado la mezcla de la etapa 6 a la columna de centrifugación QIAamp Mini (en un tubo colector de 2 mL) sin mojar el borde. Cierre la tapa, y se centrifuga a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo colector limpio de 2 ml (suministrado), y desechar el tubo que contiene el filtrado. \*
8. Abrir con cuidado la columna de centrifugación QIAamp Mini y añadir 500 µL de buffer AW1 sin mojar el borde. Cierre la tapa y centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 minuto. Colocar la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo limpio colector de 2 mL (suministrado), y desechar el tubo colector que contiene el filtrado.\*

No es necesario aumentar el volumen de buffer AW1 si el volumen de muestra original es mayor de 200 µL.

\* Flujo continuo contiene Buffer AL o Buffer AW1 y por lo tanto no es compatible con lejía. Consulte la página 6 para obtener información de seguridad.

9. Se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp Mini y añadir 500 µL de buffer AW2 sin mojar el borde. Cierre la tapa y centrifugar a toda velocidad (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 3 min.
10. Recomendaciones: Colocar la columna de centrifugación QIAamp Mini en un nuevo tubo colector de 2 mL (no incluido) y desechar el tubo colector viejo con el filtrado. Centrifugar a toda velocidad durante 1 minuto. Este paso ayuda a eliminar la posibilidad de un posible traspaso Buffer AW2.
11. Colocar la columna de centrifugación QIAamp Mini en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 mL (no incluido), y desechar el tubo colector que contiene el filtrado. Se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp Mini y se añade 200 µL de buffer AE o agua destilada. Se incuba a temperatura ambiente (15-25 ° C) durante 1 min, y luego centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) durante 1 min.

## **Anexo V. Protocolo para la extracción de ADN mediante la técnica rápida no enzimática en muestras de sangre periférica.**

- 1.- Transferir 700  $\mu$ L de sangre periférica en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL.
- 2.- Adicionar 700  $\mu$ L de buffer TKM1 y 22  $\mu$ L de tritón 100X, agitar en vortex hasta disolución total.
- 3.- Centrifugar a 3500 rpm 5 min, a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
- 4.- Repetir los pasos 2 y 3 hasta observar el botón blanco o libre de hemoglobina.
- 5.- Adicionar 700  $\mu$ L de buffer TKM1.
- 6.- Centrifugar a 3500 rpm por 5 min a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
- 7.- Resuspender el botón en 120  $\mu$ L de buffer TMK2 y adicionar 15  $\mu$ L de SDS al 10%, resuspender totalmente e incubar durante 0 min a 65 °C o hasta digestión total.
- 8.- Agregar 60  $\mu$ L de NaCl 5M, resuspender por agitación suave (por inversión).
- 9.- Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
- 10.- Recuperar el sobrenadante que contiene el ADN en un tubo eppendorf estéril y desechar el precipitado proteico.
- 11.- Agregar dos volúmenes de etanol absoluto frio y varias veces invertir suavemente el tubo hasta que el ADN se precipite.
- 12.- Centrifugar a 3500 rpm a 4°C por 5 min y decantar el exceso de etanol y agregar 400  $\mu$ L de etanol al 70% frio.
- 13.- Centrifugar a 3500 rpm a 4°C por 5 min y decantar el exceso de etanol y secar al vacío.
- 14.- Resuspender el ADN con 100  $\mu$ L de agua desionizada estéril.

### **Cuantificación de ADN**

Antes de cuantificar se debe hidratar muy bien la muestra. Posteriormente realizar una dilución de la muestra (2:200), 2  $\mu$ L de la muestra y 198  $\mu$ L de agua desionizada.

## Anexo VI. Estandarización de la qPCR para cuantificar los niveles de ADNmt circulante.

Con el objetivo de lograr cuantificar los niveles de ADNmt circulante a partir de suero en individuos expuestos y no expuestos a plaguicidas, primero se estandarizaron las condiciones de amplificación mediante PCR de punto final para cada fragmento que será utilizado en la qPCR. Para estos ensayos de PCR se utilizó ADN genómico (ADNg) ya que el ADN circulante extraído a partir de suero es muy escaso, probando con concentraciones de 100 y 120 ng de ADNg.

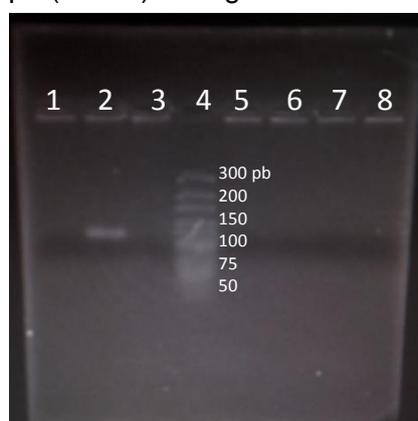
Los fragmentos de ADNmt son dos: ADNmt de 79pb y ADNmt de 230pb, el tercer fragmento pertenece al gen *GAPDH* con 123pb que se utiliza como control endógeno.

Para el primer fragmento de ADNmt de 79pb se realizaron curvas de temperatura en el rango de 50 a 62 °C, logrando amplificar este fragmento a la temperatura de 54.2 °C como se muestra en la Figura A.



**Figura A. Curva de temperatura para el fragmento de ADNmt de 79pb.** La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 3.5%, en el carril 1 se observa el fragmento de ADNmt de 79pb a la temperatura de 54.2 °C, en el carril 2-3, 5-6 se probaron las temperaturas de 56, 58, 60 y 62 °C respectivamente, en el carril 4 y 7 se colocó el marcador de peso molecular de 10 a 300pb y de 50pb, el carril 8 es el control negativo.

También se realizó una curva de concentración de magnesio (0.5µL a 2.5µL), amplificando solo a la concentración de 2µL (25mM) de MgCl<sub>2</sub> como se observa en la Figura B.



**Figura B. Curva de concentración de MgCl<sub>2</sub> para el fragmento de ADNmt de 79pb.** La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 4%, en el carril 1, 3, 5-8 se probaron los volúmenes de 2.5, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2 y 1.1 µL de MgCl<sub>2</sub> en el carril 2 se probó un volumen de 2µL (25 mM de MgCl<sub>2</sub>) y en el carril 4 se colocó el marcador de peso molecular de 10 a 300pb.

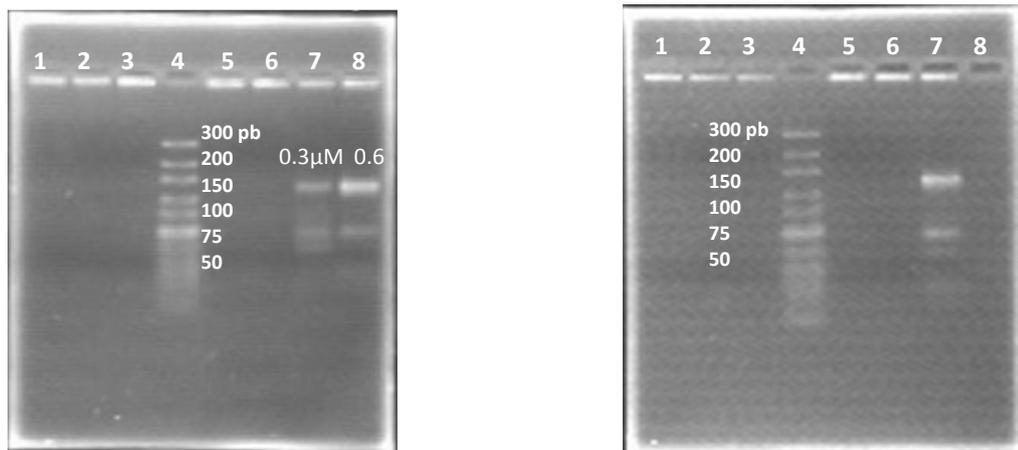
Muchas han sido las modificaciones a la mezcla de PCR desde la concentración de ADN,  $MgCl_2$ , concentración de dNTPs e iniciadores, finalmente la mezcla de PCR utilizada en estas reacciones se estandarizo de la siguiente manera:

- DNA molde ..... 2.5  $\mu$ L
- Taq buffer KCl .....2.5  $\mu$ L
- Taq buffer  $(NH_4)_2SO_4$  2.5  $\mu$ L
- DNTps ..... 2.5  $\mu$ L
- $MgCl_2$  ..... 2  $\mu$ L
- TaqPol ..... 2.5  $\mu$ L
- l. sentido ..... 2  $\mu$ L
- l. Antisentido ..... 2  $\mu$ L
- Agua ..... 6.5  $\mu$ L

Utilizando el siguiente programa de amplificación durante 40 ciclos:

- Desnaturalización inicial ..... 95 °C - 1 minuto
- Desnaturalización ..... 95 °C X 30 segundos
- Alineamiento ..... 54.2 °C, 60 ° C X 30 segundos
- Extensión ..... 72 °C X 1 minuto
- Extensión Final ..... 72 °C X 5 minutos

Después de estandarizar el fragmento de ADNmt-79, se cambiaron las condiciones de mezcla y ciclaje ya que se adquirió un master mix para PCR convencional. Para el gen *GAPDH* el cual será utilizado como control endógeno en la qPCR se está realizando la estandarización de un fragmento de 123pb para ello se han probado gradientes de temperatura de 50 a 70 °C logrando amplificar el fragmento a temperaturas de 60.6 y 60.9 °C como se muestra en las Figuras C y D, aunque estos aun presentan bandas inespecíficas por lo que es necesario seguir ajustando la temperatura hasta obtener sola una banda.



**Figura C y D. Curva de temperatura para el fragmento de *GAPDH* de 123pb. C)** La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 5%, en el carril 7 y 8 se probaron las temperaturas de 60.6 y 60.9 ° C, y las concentraciones de 0.3 y 0.6  $\mu$ M para los iniciadores, en el carril 4 se colocó el marcador de peso molecular de 10 a 300pb. **D)** El gel de agarosa estaba a una concentración del 5%, en el carril 7 se probó la temperatura de 60.9 ° C y en el carril 4 se colocó el marcador de peso molecular de 10 a 300pb.

Después de estandarizar el fragmento de ADNmt-79, se cambiaron las condiciones de mezcla y ciclaje ya que se adquirió un master mix para PCR convencional, como se muestra a continuación:

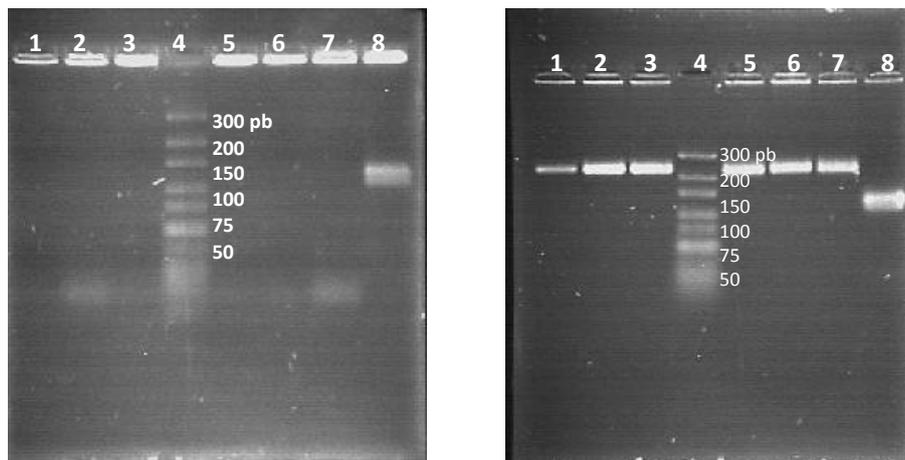
- ADN molde ..... 4.2  $\mu$ L
- Master Mix .....12.5  $\mu$ L
- l. sentido ..... 2  $\mu$ L
- l. Antisentido..... 2  $\mu$ L
- Agua ..... 4.3  $\mu$ L

Utilizando el siguiente programa de amplificación durante 40 ciclos:

- Desnaturalización inicial ..... 95 °C - 4 minuto
- \*Desnaturalización ..... 95 °C X 30 segundos
- \*Alineamiento ..... 60°C X 30 segundos
- \*Extensión ..... 72 °C X 1 minuto
- Extensión Final ..... 72 °C X 5 minutos

\* Por 40 ciclos.

Continuando con el gen *GAPDH* se probó a la temperatura de 60.6 y 60.9 °C, como se muestra en la figura E y F.



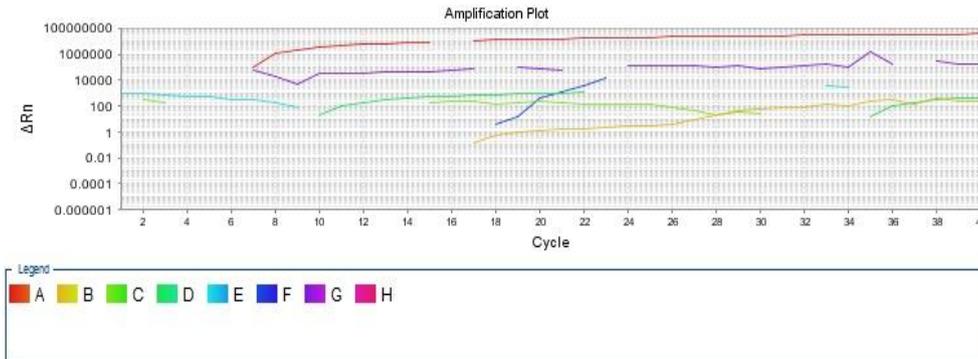
**Figura E y F. Curva de temperatura para el fragmento de *GAPDH* de 123pb y ADNmt-230. E)**

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 5%, en el carril 8 se probó la temperatura de 60.6°C, para el gen *GAPDH*, en el carril 4 se colocó el marcador de peso molecular de 10 a 300pb.

**F)** El gel de agarosa estaba a una concentración del 5%, del carril 1-3, 5-7 se probó la temperatura de 50.1, 51.8, 54.1, 56.7, 58.8 y 59.9°C para el gen ADNmt-230, en el carril 8 se probó la temperatura de 60.9 °C para el gen *GAPDH* y en el carril 4 se colocó el marcador de peso molecular de 10 a 300pb.

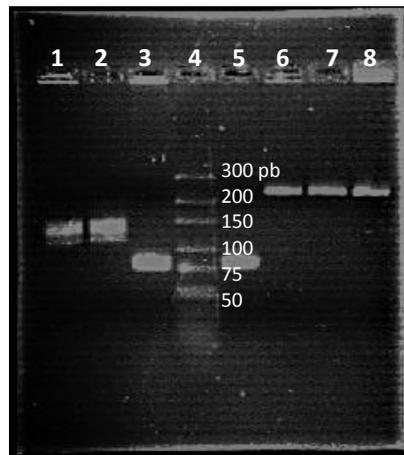
En la figura F también se muestra la curva de temperatura realizada para el fragmento ADNmt-230 de 50.1 a 60.0°C, en estas nuevas condiciones de PCR la mezcla tenía una concentración de 400  $\mu$ M de DNTP's y 4 mM de  $Mg^{2+}$ .

Con estas condiciones obtenidas de la PCR convencional se diseñó un experimento para qPCR con 8 reacciones que incluían a los tres genes con ADNg y ADNc a una concentración de 100 ng y una temperatura de alineamiento a 60°C los resultados se observan en la figura G.



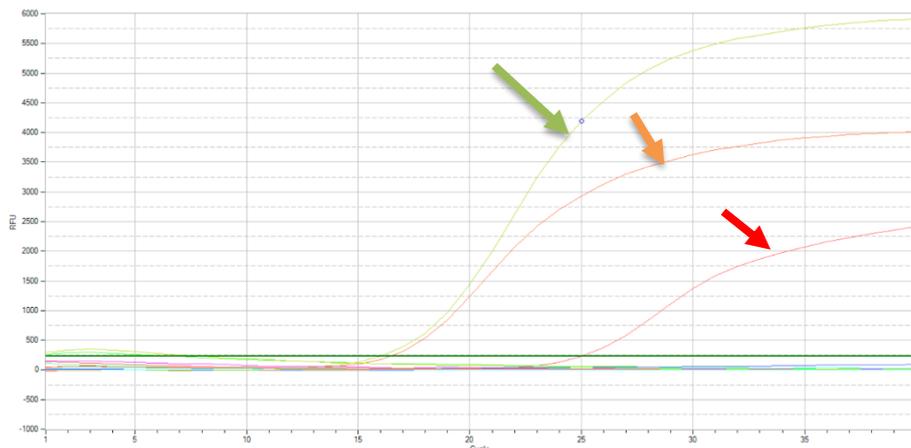
**Figura G. Ensayo de qPCR para ADNmt.** Se muestra la gráfica de amplificación del ensayo número 7, no se observa amplificación en ninguna de las muestras analizadas.

Con resultados negativos en la qPCR realizada en el equipo de tiempo real 7500 de Applied Biosystems, se corrieron en un gel de agarosa al 5% los productos de este ensayo, mostrados en la figura H.



**Figura H. Resultados del experimento para qPCR.** La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 5%, en el carril 1 y 2 corresponde al gen *GAPDH* (123pb), en ADNg y ADNc respectivamente, el carril 3 y 5 corresponde al fragmento de ADNmt de 79 pb en ADNg y ADNc respectivamente, del carril 6 – 8 corresponde al fragmento de ADNmt- 230 pb para ADNg, ADNc y ADNg respectivamente, en el carril 4 se colocó el marcador de peso molecular de 10 a 300pb.

El experimento se repitió pero ahora utilizando un equipo de tiempo real diferente (PikoReal 96) disminuyendo la cantidad de ADN (25ng), utilizando ADNg y realizando una curva de iniciadores con una dilución 1:10, ver figura I.

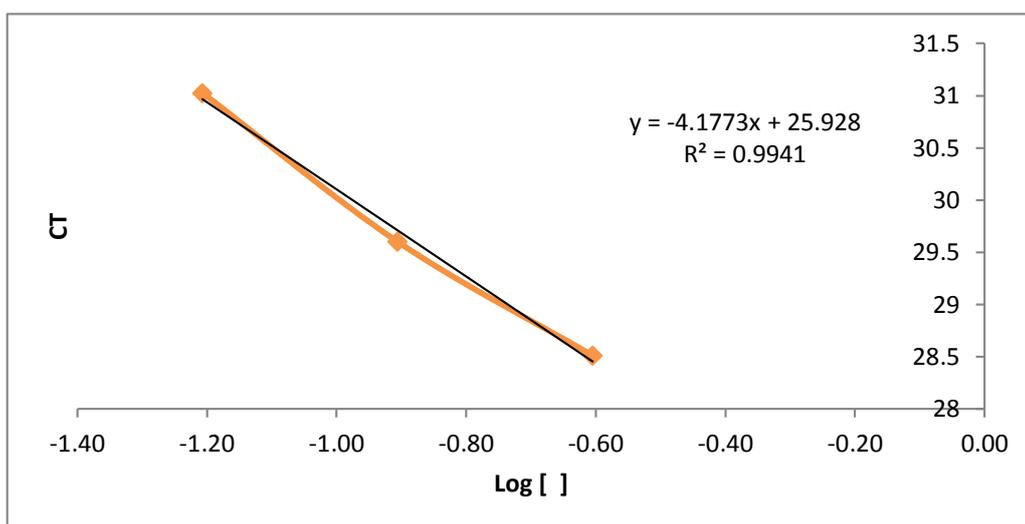


**Figura I. Resultados del experimento para qPCR.** Se muestra la gráfica de amplificación para los tres fragmentos la flecha verde corresponde al fragmento de 230pb, la flecha naranja el fragmento de 79pb y la flecha roja señala al fragmento de 123pb para el gen de referencia *GAPDH*.

Con los resultados obtenidos de este experimento se estableció la concentración final en la reacción de iniciadores a 0.2  $\mu$ M, ya que solo a esta concentración se observó amplificación.

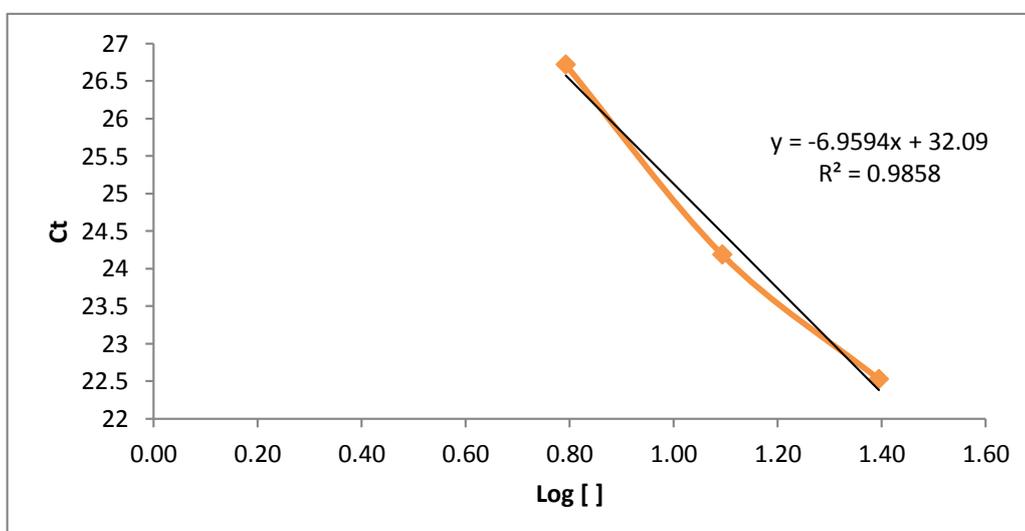
Posteriormente para la validación de los experimentos de qPCR se procedió a realizar una curva de concentración de ADN de 4 puntos (25, 12.5, 6.25 y 3.125 ng de ADNc).

La gráfica de validación para el gen de referencia *GAPDH* se muestra en la figura J.



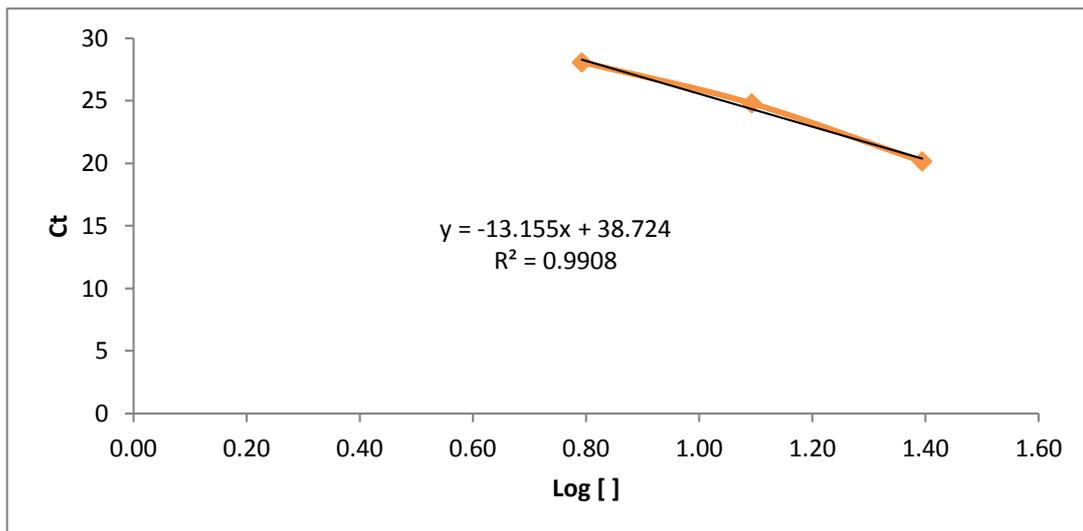
**Figura J. Grafica de validación para GAPDH.** Se muestra la relación del logaritmo de la concentración de ADNc contra el valor de Ct. Los puntos corresponden a las concentraciones de 6.2, 12.5 y 25 ng de ADNc.

La grafica de validación del fragmento de ADNmt de 79 pb se muestra en la figura K.



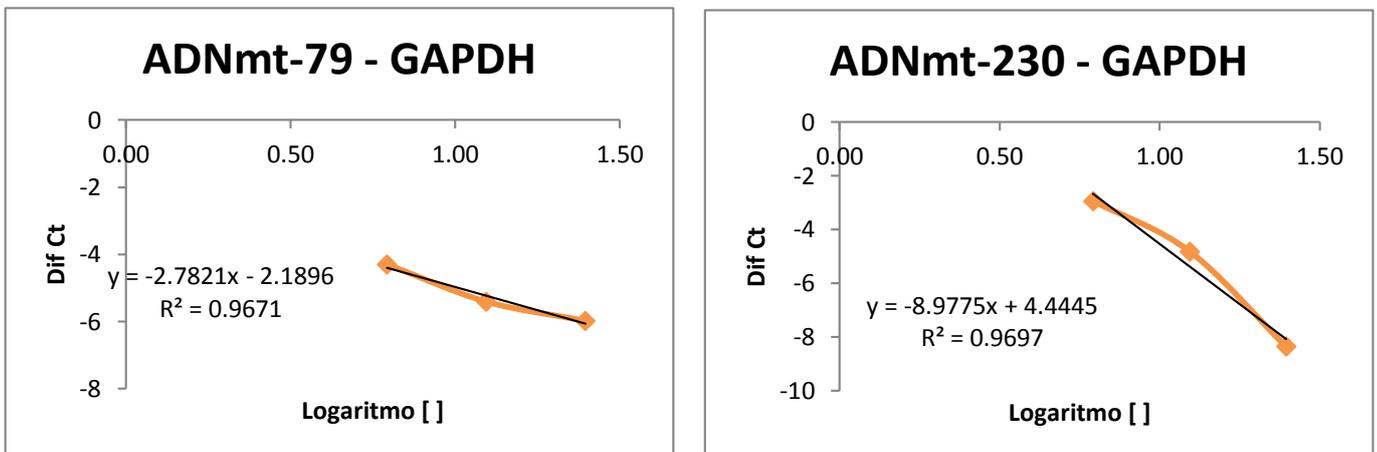
**Figura K. Grafica de validación para ADNmt-79.** Se muestra la relación del logaritmo de la concentración de ADNc contra el valor de Ct. Los puntos corresponden a las concentraciones de 6.2, 12.5 y 25 ng de ADNc.

La grafica de validación para el fragmento de ADNmt de 230 pb se muestra en la figura L.



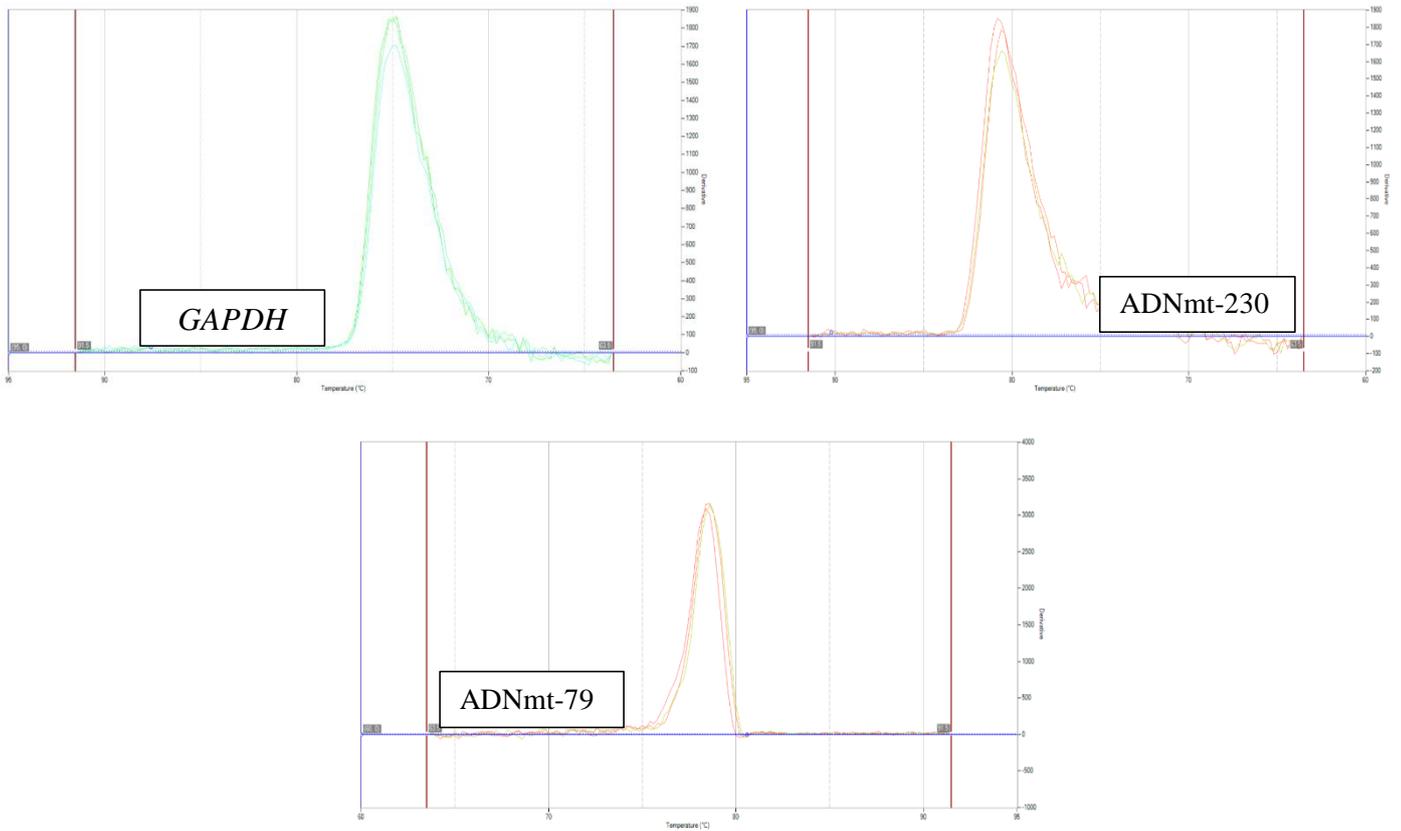
**Figura L. Grafica de validación para ADNmt-230.** Se muestra el logaritmo de la concentración de ADNc sobre el valor del Ct. Los puntos corresponden a las concentraciones de 6.2, 12.5 y 25 ng de ADNc.

Las gráficas de validación entre el gen de referencia *GAPDH* y los genes de interés (ADNmt-79, 230) se muestran en la figura M.



**Figura M. Grafica de validación entre el gen de referencia y de interés.** Se muestra el logaritmo de la concentración de ADNc sobre la diferencia del Ct del control de interés menos el Ct del gen de referencia.

Finalmente para comprobar la especificidad de los fragmentos de interés se realizó una curva de fusión de 60 a 95°C al final del programa de ciclaje, una imagen representativa se muestra en la figura N.



**Figura N. Curva de Fusión.** Se muestran las curvas de fusión para los tres productos de qPCR utilizados en el ensayo, no se observan productos inespecíficos.

## Anexo VII. Historial de síntomas de intoxicación en los fumigadores.

Síntomas	Expuestos n= 51 (%)
Irritación de la mucosa (picor ocular, rinitis, estomatitis).	29 (59.18)
Dolor de cabeza.	17 (34.69)
Irritación de las vías respiratorias.	14 (28.57)
Mareo.	14 (28.57)
Irritación de la piel.	12 (24.49)
Debilidad, fatiga.	11 (22.45)
Desorden del sueño.	7 (14.29)
Dificultad para respirar.	7 (14.29)
Nausea.	6 (12.24)
Opresión en el pecho, disnea.	6 (12.24)
Calambre.	5 (10.20)
Trastornos de la concentración.	5 (10.20)
Inestabilidad emocional.	4 (8.16)
Diarrea, calambres abdominales.	2 (4.08)
Alteración de la memoria.	2 (4.08)
Pérdida del apetito.	2 (4.08)
Trastornos del equilibrio, caminar desequilibrado.	2 (4.08)
Temblores.	2 (4.08)
Convulsiones.	1 (2.01)

## Anexo VIII. Índice de exposición calculado en los fumigadores.

Variables	Categoría de referencia	Categorías (puntaje asignado)		
1.- Años de trabajo.	≤ 1 – 5 años (1)	≥ 6 años (2)		
2.- Número de plaguicidas.	1 – 3 plaguicidas (1)	≥ 4 plaguicidas (2)		
3.- Tipo de plaguicida utilizado.	Bioplaguicida (1)	Carbamato (2)	Organofosforado (3)	Mezcla (4)
4.- Periodo de aplicación más reciente.	≤ 7 días (1)	> 7 días (2)		
5.- Cantidad aplicada.	1 – 5 Litros (1)	6 – 20 Litros (2)	≥ 30 Litros (3)	
6.- Uso de material de protección.	Sí (1)	No (2)		
7.- Número de material de protección.	1 – 2 equipos (1)	3 – 4 equipos (2)	≥ 5 equipos (3)	
8.- Presencia de síntomas de intoxicación.	No (1)	Sí (2)		

## REFERENCIAS

- Adad, LM., Rodrigues, HH., Kvitko, K., *et al.* (2015). Occupational exposure of workers to pesticides: Toxicogenetics and susceptibility gene polymorphisms. *Genetics and Molecular Biology* 38, (3): 308-15.
- Al-Harras, Houssen, MM., Shaker, M., *et al.* (2016). Polymorphisms of Glutathione S-transferase pi 1 and Toll-like receptors 2 and 9: Association with breast cancer susceptibility. *Oncology Letters*.
- Au WW., Sierra-Torres CH., Cajas-Salazar N., *et al.* (1999). Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the Influence from genetic susceptibility. *Environ Health Perspect*; 107: 501-5.
- Barros, N., Ricky L., Buhler, W., *et al.* (2016). Contributing factors for acute illness/injury from childhood pesticide exposure in North Carolina, USA, 2007–2013. *Toxics* 4, (1): 4.
- Bernal-Hernández, YY., Medina-Díaz, IM., Barrón-Vivanco, BS., *et al.* (2014). Paraoxonase 1 and its relationship with pesticide biomarkers in indigenous Mexican farmworkers. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* 56, no. (3): 281–90.
- Borghini, A., Mercuri, A., Turchi, S., *et al.* (2015). “Increased circulating cell-free DNA levels and mtDNA fragments in interventional cardiologists occupationally exposed to low levels of ionizing radiation: Ccf-DNA and occupational exposure to ionizing radiation.” *Environmental and Molecular Mutagenesis* 56, (3): 293–300.
- Budnik L T., Stefan K., Xaver B., *et al.* (2013). Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic halo-alkane-based pesticides. Hoque. *PLoS ONE* 8, (5).
- Burns, CJ., McIntosh, LJ., Mink, PJ., AM., *et al.* (2013). Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: Review of the epidemiologic and animal studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 16, (3-4): 127-283.
- Cannino G., Ferruggia E., Luparello C., Rinaldi AM. (2009) Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion* 9: 377–384.
- Case, Adam. (2017). On the origin of superoxide dismutase: An evolutionary perspective of superoxide-mediated redox signaling. *Antioxidants* 6, (4): 82.
- Chen C., Xu J., Huang F. (2013). Recent players in the field of acute myocardial infarction biomarkers: circulating cell-free DNA or microRNAs? *Int J Cardiol*; 168:2956–2957.
- Chen, H, Ming Y, Ming L, Ruie Z, Qihan Z, Wenrui Z, *et al.* (2012) Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease.” *Molecular and Cellular Biochemistry* 363, (1–2).
- Chiu RW, Chan LY, Lam NY, Tsui NB, Ng EK, *et al.* (2003) Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clinical chemistry* 49: 719–726.
- Da Costa, Laura A., Alaa Badawi, y Ahmed El-Sohemy. (2012). Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Annals of Nutrition and Metabolism* 60, (3): 27-36.
- Dantoine T, Debord J, Merle L, Charmes JP. (2003) Roles of Paraoxonase 1 in organophosphate compounds toxicity and in atherosclerosis. *Rev Med Interne*, (24): 436–42.

- Dawson, AH., Eddleston, M., Senarathna, L., *et al.* (2010). Acute human lethal toxicity of agricultural pesticides: A prospective cohort study. Editado por Mervyn Singer. PLoS Medicine 7, (10): e1000357.
- Despotovic, M., Stoimenov, T., Stankovic, I., *et al.* (2015). Gene Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Antioxidant Enzymes in Bronchial Asthma». *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 24, (2): 251-56.
- Du, Y., Y. Nomura, G., Satar, Z., *et al.* (2013). Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, (29): 11785-90.
- Echart M., Aurélio M. (2011). Estudio de la asociación entre el polimorfismo Ala16Val de la enzima superóxido dismutasa dependiente de manganeso, la obesidad, y marcadores bioquímicos oxidativos e inflamatorios. Universidad de Nuevo León.
- Ensley S. (2012). Pyrethrins and pyrethroids. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. 2a ed. (Gupta RC, ed) Academic Press, New York.
- Eskenazi, B., Marks, A. R., Bradman, A., Harley, K., Barr, D. B., Johnson, C., *et al.* (2007). Organophosphate pesticide exposure and neurodevelopment in young Mexican-American children. *Environ Health Perspect*, 115, 792-798.
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., *et al.* (2015). Antioxidant Responses and Cellular Adjustments to Oxidative Stress». *Redox Biology* (6): 183-97.
- Fang, C., Wei, X., Wei Y. (2016). Mitochondrial DNA in the Regulation of Innate Immune Responses». *Protein & Cell* 7, (1): 11-16.
- Fernández, D., Mancipe, L., Fernández, D. (2010). "Intoxicación por organofosforados". *Revista Médica*. Vol 18. (1). (págs. 84-92).
- Fernández, EJ. González Salso, H. Díaz Padron, *et al.* (2002). Exposure to cholinesterase inhibitor pesticides of fumigators during a massive campaign against *Aedes Aegypti* in Havana city. *Rev. Cubana Salud Trabajo* 3(1-2).
- Flekac, M., Jan S, Jirina H., *et al.* (2008). Gene Polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Medical Genetics* 9, (1).
- Gresner, P., Gromadzinska, J., Wasowicz W. (2007). Polymorphism of selected enzymes involved in detoxification and biotransformation in relation to lung cancer. *Lung Cancer*, 57:1–25.
- Habig, WH., Pabst, MJ., Jacoby, WB. (1976). Glutathione-S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*; 249:7130–9.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Holley, AK., Bakthavatchalu, V., Velez-Roman, JM., Daret K., Clair, St. (2011). Manganese Superoxide Dismutase: Guardian of the Powerhouse. *International Journal of Molecular Sciences* 12, (12) 7114-62.
- Hongsibsong, S., Sittitorn, N., Sapbamrer R. (2017). Association of health symptoms with low-level exposure to organophosphates, DNA damage, AChE activity, and occupational knowledge and practice among rice, corn, and double-crop farmers. *Journal of Occupational Health* 59, (2): 165-76.

Huamaní-Pacsi, C. Sánchez- Ramírez, RP., Cataño, HC., *et al.* (2005). Actividad de colinesterasa plasmática y sintomatología presente en fumigadores del valle de Mala, expuestos a plaguicidas anticolinesterasas. *Ciencia e investigación* 8 (2). ISSN 1561-0861.

Jahr S., Hentze H., Englisch S., *et al.* (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61:1659–1665.

Johansson, AS., Stenberg, G., Widersten M., *et al.* (1998) Structure-activity relationships and thermal stability of human glutathione transferase P1–1 governed by the H-site residue 105. *J Mol Biol* 278: 687–98.

Juárez-Quezada, LA. (2015). Niveles de colinesterasa sérica y su relación con los factores de riesgo en fumigadores del área agrícola de Monterrey azucarera lojana en la ciudad de Catamayo. Universidad Nacional de Loja.

Juárez-Velázquez, R., Canto P., Canto-Cetina T., Rangel-Villalobos H., *et al.* (2010). Analysis of polymorphisms in genes (AGT, MTHFR, GPIIIa, and GSTP1) associated with hypertension, thrombophilia and oxidative stress in mestizo and amerindian populations of Mexico.” *Disease Markers*, (5) 323–31.

Julian MW., Shao G., Vangundy ZC., *et al.* (2013). Mitochondrial transcription factor A, an endogenous danger signal, promotes TNF alpha release via RAGE- and TLR9-responsive plasmacytoid dendritic cells.

Kapka-Skrzypczak, L., Małgorzata C., Maciej, S., *et al.* (2011). Biomonitoring and biomarkers of organophosphate pesticides exposure -state of the Art. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM* 18, (2): 294–303.

Kazemi, M., AM., Tahmasbi, R., Valizadeh, A., *et al.* (2012) Organophosphate pesticides: A general review. *Agricultural Science Research Journals* Vol. 2(9), pp. 512- 522.

Kim, S., Sang K., Joo-Ho C., *et al.* (2015). Genetic polymorphisms of glutathione-related enzymes (GSTM1, GSTT1, and GSTP1) and schizophrenia risk: A meta-analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 16, (8): 19602-11.

Kinnula, V L. (2004). Two functional variants of the superoxide dismutase genes in finnish families with asthma.” *Thorax* 59, no. (2): 116–19.

Kung, CT., Sheng-Yuan H., Tsung-Cheng T., *et al.* (2012). Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. *Journal of Translational Medicine* 10, (1): 130.

Lee HC., Wei YH. (2000). Mitochondrial role in life and death of the cell. *Journal of Biomedical Science* 7: 2–15.

Liu, Lin-Lin., Zhao, H., Teng-Fei M., *et al.* (2015). Identification of valid reference genes for the normalization of RT-qPCR expression studies in human breast cancer cell lines treated with and without transient transfection. Edited by Yves St-Pierre. *PLOS ONE* 10, (1).

London, L., Beseler, C., Maryse F., Bouchard, DC., *et al.* (2012). Neurobehavioral and neurodevelopmental effects of pesticide exposures. *NeuroToxicology* 33, (4): 887-96.

M Nurulain, S., Szegi, P., Tekes K., *et al.* (2013). Antioxidants in Organophosphorus Compounds Poisoning.” *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 64, no. (1).

Maiti, PP., Dubey, S., Saha P. (2011). Study of various poisonings: A review. *Indo Global J Pharmaceut Sci*; 1(4):304e14.

- Malik AN., Czajka A. (2013). Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? *Mitochondrion*; 13:481–492.
- Mármol-Maneiro, L., Fernández-D'Pool, J., Sánchez, B.J., Sirit, Y. (2003). Perfil seminal en trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. *Investigación Clínica*, 44(2), 105-117.
- Masayeva BG., Mambo E., Taylor R.J., *et al.* (2006). Mitochondrial DNA content increase in response to cigarette smoking. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 15: 19–24.
- Mehra, N., Penning, M., Maas, J., *et al.* (2007). Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 13, no. (2): 421–26.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- Nakahira, K., Sun-Young K., A J. Rogers., *et al.* (2013). Circulating Mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: Derivation and validation. *PLoS Medicine* 10, (12).
- Ngo, Mai A., Michael O'Malley, and Howard I. Maibach. (2010). Percutaneous Absorption and Exposure Assessment of Pesticides." *Journal of Applied Toxicology: JAT* 30, (2): 91–114.
- Oka T., Hikoso S., Yamaguchi O., *et al.* (2012). Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature*; 485:251–255.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2012). Actualización del Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Roma: FAO, 21.
- Peters DL, Pretorius PJ. (2011). Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA - A new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta* 412:806–811.
- Pisetsky DS. (2012). The origin and properties of extracellular DNA: From PAMP to DAMP. *Clin Immunol* 144:32–40.
- Ramírez-Jiménez, R., Mejía-Saucedo, R., Calderón-Hernández, J., Montero-Montoya, R., Yáñez-Estrada, L. (2014). Concentraciones urinarias de metabolitos de plaguicidas organofosforados en niños y adolescentes de una zona agrícola de México. *Revista Iberoamericana de Ciencias* ISSN 2334-2501.
- Ramírez-Vargas MA, Huerta-Beristain G, Romero-Alarcón LC, Flores-Alfaro E, Rojas-García E, Moreno-Godínez ME. 2017. Methamidophos induces cytotoxicity and oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells. *Environ Toxicol.* 32(1):147-155.
- Rendón MG. (2013). Determinación de residuos de carbamatos mediante LC-ESI-MS/MS en tomate riñón (*Lycopersicon esculentum*) expendidos en mercados de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador: Escuela superior Politécnica del Litoral.
- Requena M. (2009). Estudio andaluz de prevalencia de diversas patologías en áreas con distinto nivel de utilización de plaguicidas. Granada España: Universidad de Granada.
- Rojas-García AE., Medina-Díaz IM., Robledo-Marengo ML., *et al.* (2011). Hematological, biochemical effects, and self-reported symptoms in pesticide retailers. *J Occup Environ Med.* 53:517–521.
- Roubicek, DA., de Souza-Pinto NC. (2017). Mitochondria and mitochondrial DNA as relevant targets for environmental contaminants. *Toxicology* 391: 100–108.

- Sailaja K., Surekha D., Rao DN., *et al.* (2010). Association of the *GSTP1* gene (Ile105Val) polymorphism with chronic myeloid leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*, 11: 461-464.
- Sharma, R., Upadhyay, G., Siddiqi, N., Sharma B. (2013). Pesticides-induced biochemical alterations in occupational North Indian suburban population. *Human & Experimental Toxicology* 32, (11) 1213–27.
- Shimoda-Matsubayashi S., Matsumine H., Kobayashi T. *et al.* (1996). Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. *Biochem Biophys Res Commun*; 226:561–5.
- Simmons JD., Lee YL., Mulekar S., *et al.* (2013). Elevated levels of plasma mitochondrial DNA DAMPs are linked to clinical outcome in severely injured human subjects. *Ann Surg*; 258:591–596.
- Sistema nacional de vigilancia epidemiológica. (2013). Panorama histórico de morbilidad y mortalidad por Intoxicación por plaguicidas en México 1995-2012 Sistema único de información. Número 34, volumen 30, semana 34 del 18 al 24 de agosto del 2013.
- Soltaninejad, K., Shadnia, S. (2014). History of the use and epidemiology of organophosphorus poisoning. In *Basic and Clinical Toxicology of Organophosphorus Compounds*, edited by Mahdi Balali-Mood and Mohammad Abdollahi, 25–43. London: Springer London.
- Taghavian, F., Gholamhassan V., Mohammad A., Malekirad, AA. (2017). Comparative Toxicological Study between Exposed and Non-Exposed Farmers to Organophosphorus Pesticides». *Cell J (Yakhteh)*, (1).
- Terry, AV. (2012). Functional Consequences of Repeated Organophosphate Exposure: Potential Non-Cholinergic Mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics* 134, (3) 355-65.
- Tong YK., Lo, YM. (2006). Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clin Chim Acta* 363:187–196.
- Toyoda, Yu, T, Takada, y Hiroshi Suzuki. (2017). Spontaneous production of glutathione-conjugated forms of 1, 2-dichloropropane: comparative study on metabolic activation processes of dihaloalkanes associated with occupational cholangiocarcinoma. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017 1-9.
- Tsang JC., Lo YM. (2007). Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology* 39:197–207.
- Vikkey, HA., Dossou F., Yehouenou PE., Hountikpo H., *et al.* (2017). Risk factors of pesticide poisoning and pesticide users' cholinesterase levels in cotton production areas: Glazoué and Savè Townships, in Central Republic of Benin. *Environmental Health Insights* (11).
- Waheed, S., Crispin H., Andrew JS., *et al.* (2017). Pesticides contaminated dust exposure, risk diagnosis and exposure markers in occupational and residential settings of Lahore, Pakistan. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (56) 375-82.
- Wang, L., Liang X., Qigao Z., *et al.* (2015). Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute myocardial infarction patients. *Coronary Artery Disease* 26, (4): 296–300.
- Wang, LI., Miller, DP., Sai, Y., *et al.* (2001). Manganese superoxide dismutase alanine-to-valine polymorphism at codon 16 and lung cancer risk. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 93, (23): 1818-21.
- Watanabe, Kenji., Shuichi S., Yusuke O., *et al.* (2014). Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *BioMed Research International*, 1–10.

Wei, B., You Z., Zhuoqun X., Jun R., Huan C., *et al.*, (2013). GSTP1 Ile105Val polymorphism and prostate cancer risk: Evidence from a meta-analysis. PLoS ONE 8, (8) e71640.

Yu EP., Bennett MR. (2014). Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. Trends Endocrinol Metab 25:481–487

Zepeda-Arce, R, AE Rojas-García, A Benitez-Trinidad, *et al.* (2017). Oxidative stress and genetic damage among workers exposed primarily to organophosphate and pyrethroid Pesticides. Environmental Toxicology 32, nº 6: 1754-64.

Zhang JZ., Liu Z., Liu J., *et al.* (2014). Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF-kappa B expression in lung tissue. Int J Mol Med 33:817–824.

Zhang Q., Raouf M., Chen Y., *et al.* (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. Nature; 464:104–107.

Zhang W., Jiang F., y Feng OJ. (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci. 1, 125-144.

Zhong S., Ng, MC., Lo YMD., Chan JC., Johnson PJ. (2000). Presence of mitochondrial tRNA (Leu (UUR) A to G 3243 mutation in DNA extracted from serum and plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. J Clin Pathol 53: 466–9.