



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE MAGÍSTER EN ANÁLISIS BIOLÓGICO Y DIAGNÓSTICO DE
LABORATORIO

**Evaluación de polimorfismos de genes detoxificadores Glutation
Transferasa *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y Paraoxonasa-1 *PON-1*, en
trabajadores expuestos a plaguicidas del cantón Calvas.**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

AUTOR: Cabrera Bejarano, Andrea Katerine, Lcda.

DIRECTORA: Arévalo Jaramillo, Ana Paulina, Mgtr.

LOJA - ECUADOR

2018



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2018

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Magister.

Ana Paulina Arévalo Jaramillo.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: **“Evaluación de polimorfismos de genes detoxificadores Glutation Transferasa *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y Paraoxonasa-1 *PON-1*, en trabajadores expuestos a plaguicidas del cantón Calvas”**, realizado por **Cabrera Bejarano Andrea Katerine**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre 2018.

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Cabrera Bejarano Andrea Katerine** declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Evaluación de polimorfismos de genes detoxificadores Glutation Transferasa *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y Paraoxonasa-1 *PON-1*, en trabajadores expuestos a plaguicidas del cantón Calvas”, de la Titulación Magister en Análisis Biológico y Diagnostico de Laboratorio, siendo Mgtr. Ana Paulina Arévalo Jaramillo directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f)

Autor: Cabrera Bejarano Andrea Katerine

Cédula: 1105026049

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado; por ello, con toda la humildad que de mi corazón puede emanar, dedico primeramente mi trabajo a Dios.

De igual forma, dedico este trabajo a mis padres Isauro y Fátima, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional con el fin de que me supere y alcance mis metas propuestas.

A mi esposo Jonathan y mi hija Amelia por brindarme su cariño y paciencia en este trayecto.
A mis hermanos Marcela y Marcelo por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A toda mi Familia por tener la dicha de tenerles junto a mí, y por transferirme todo su aprecio, afecto, confianza y sobre todo el valor de luchar por alcanzar el anhelo deseado.

“Considero más valiente al que conquista sus deseos que al que conquista a sus enemigos, ya que la victoria más dura es la victoria sobre uno mismo”. Aristóteles

Andrea Katerine Cabrera Bejarano

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento a la Universidad Técnica Particular de Loja. Área Biológica y Biomédica, por haberme permitido formar parte de su programa de Maestría.

A mis docentes por participar en mi formación profesional durante mi tiempo de estudio y preparación, los cuales depositaron su sabiduría, transformándose no solo en educadores si no en amigos.

De manera especial mi eterna gratitud a mi tutora de tesis Mgtr. Ana Paulina Arévalo Jaramillo por brindarme la oportunidad de convertirme en una investigadora y poder ampliar mi conocimiento y experiencia, así mismo al Ph. D. Luis Guamán, Mgtr. Paola Dalgo, e Ing. Verónica Cueva gracias a todos ustedes por su tiempo, orientación y dedicación al revisar el trabajo y ayudar a que este cubriese los requerimientos de estilo y forma que se solicitan en una investigación.

Al departamento de Ciencias de la Salud, sección Genética Humana, Microbiología y Bioquímica Clínica por brindarme sus instalaciones y equipos, los mismos que permitieron el desarrollo de este trabajo investigativo.

A mis padres por enseñarme y orientarme a que el regalo más valioso, es el estudio.

Y como no olvidar a los estudiantes de laboratorio de Genética humana Mónica, Tito y Nixon por su apoyo y confianza.

Finalmente, a mis familiares y amigos por su motivación y apoyo en todo momento, gracias por estar ahí.

“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica”. Aristóteles

Andrea Katherine Cabrera Bejarano

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| CARATULA..... | i |
| APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN..... | ii |
| DEDICATORIA..... | iv |
| AGRADECIMIENTO..... | v |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | vi |
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| LISTA DE TABLAS..... | viii |
| ABREVIATURAS..... | viiix |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO..... | 5 |
| 1.1 Plaguicidas..... | 6 |
| 1.2 Metabolismo de xenobióticos..... | 9 |
| 1.3 Glutation S-Transferasa (GST)..... | 10 |
| 1.4 Paraoxonasa..... | 12 |
| CAPITULO II. MÉTODOS..... | 15 |
| 2.1 Fin del proyecto:..... | 16 |
| 2.2 Propósito del proyecto:..... | 16 |
| 2.3 Componentes del proyecto:..... | 16 |
| 2.4 Tipo de Estudio:..... | 16 |
| 2.5 Población:..... | 16 |
| 2.6 Parámetros bioquímicos, hematológicos y antropométricos:..... | 16 |
| 2.7 Análisis genético:..... | 17 |
| 2.7.1 Detección de alelos nulos de los genes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> :..... | 17 |
| 2.7.2 Detección de polimorfismo Ile105Val del gen <i>GSTP1</i> :..... | 18 |
| 2.7.3 Detección de polimorfismos del gen <i>PON1</i> :..... | 19 |
| 2.8 Análisis estadístico..... | 20 |
| CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 22 |
| CONCLUSIÓN..... | 34 |
| RECOMENDACIONES..... | 35 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 36 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1. | Reacción general de las Isoenzimas GST..... | 10 |
| Figura 2. | Estructura cristalográfica de glutatión transferasa | 11 |
| Figura 3. | Estructura general de PON1..... | 13 |
| Figura 4. | Fragmentos amplificados de los genes <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> | 18 |
| Figura 5. | PCR-RFLPs con enzima de restricción BSMA1 | 19 |
| Figura 6. | Fragmentos amplificados del gen <i>PON1</i> (Gln192Arg) y electroferograma..... | 20 |
| Figura 7. | Fragmentos amplificados del gen <i>PON1</i> (Leu55Met) y electroferograma | 30 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Clasificación según el grado de toxicidad. | 7 |
| Tabla 2: Parámetros antropométricos, bioquímicos y hematológicos de la población estudiada. | 23 |
| Tabla 3: Frecuencia de alelos nulos de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en población general. | 24 |
| Tabla 4: Frecuencia de alelos nulos de los genes <i>GSTM1</i> y <i>GSTT1</i> en expuestos y no expuestos. | 24 |
| Tabla 5: Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ile105Val del gen <i>GSTP1</i> ... | 25 |
| Tabla 6: Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ile105Val del gen <i>GSTP1</i> en expuestos y no expuestos. | 25 |
| Tabla 7: Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos Leu55Met y Gln192Arg del gen <i>PON1</i> | 26 |
| Tabla 8: Frecuencias genotípicas de los polimorfismos Leu55Met y Gln192Arg del gen <i>PON1</i> según el grupo expuestos y no expuestos. | 26 |
| Tabla 9: Alelo nulo de <i>GSTM1</i> y características antropométricas en el grupo expuesto y no expuesto. | 27 |
| Tabla 10: Alelo nulo de <i>GSTT1</i> y características antropométricas y bioquímicas en el grupo no expuesto. | 28 |
| Tabla 11: Polimorfismo rs854560 (Leu55Met) de <i>PON1</i> y parametros antropometricos y bioquimicos en el grupo no expuesto. | 28 |
| Tabla 12: Polimorfismo rs854560 (Leu55Met) en hombres no expuestos. | 29 |
| Tabla 13: Polimorfismo rs662 (Gln192Arg) de <i>PON1</i> y parametros antropometricos y bioquimicos en poblacion total analizada. | 29 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| Arg | Arginina |
| GGT | Gama glutamil transpeptidasa |
| Gln | Glutamina |
| GST | Glutation S-Transferasa |
| <i>GSTM1</i> | Gen de Glutation S-Transferasa clase mu |
| <i>GSTP1</i> | Gen de Glutation S-Transferasa clase pi |
| <i>GSTT1</i> | Gen de Glutation S-Transferasa clase theta |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| ICC | Índice cintura cadera |
| Ile | Isoleucina |
| IMC | Índice de masa corporal |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| Leu | Leucina |
| Met | Metionina |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PAD | Presión arterial diastólica |
| PAS | Presión arterial sistólica |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PCR-RFLP | Reacción en Cadena de la Polimerasa y Fragmentos de restricción |
| PON | Paraoxonasa |
| <i>PON-1</i> | Gen de la Paraoxonasa 1 |
| PON-1 | Proteína Paraoxonasa-1 |
| PON-2 | Proteína Paraoxonasa-2 |
| PON-3 | Proteína Paraoxonasa-3 |
| TGO | Transaminasa glutámico oxalacética |
| TGP | Transaminasa glutámico pirúvica |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| SNP | Polimorfismo de Nucleótido Simple |
| Val | Valina |

RESUMEN

Los plaguicidas son una de las familias de productos químicos más ampliamente empleadas por el hombre, con diferentes efectos sobre la salud, los cuales pueden variar según la capacidad individual para metabolizarlos. Las enzimas glutathion transferasas y paraoxonasas constituyen sistemas importantes involucrados en el metabolismo y la desintoxicación del organismo; sin embargo, la presencia de variantes genéticas podría modificar la capacidad detoxificadora repercutiendo en el estado de salud de los individuos. En el presente estudio se evaluaron polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *PON-1*, en 189 personas del cantón Calvas, provincia de Loja – Ecuador, 121 expuestas a plaguicidas y 68 no expuestos, mediante PCR multiplex, PCR–RFLPs y PCR–secuenciación para el genotipado. Las frecuencias de los alelos nulos para *GSTM1* y *GSTT1* en la población general fue de 44,97 % y 48,51 %, respectivamente, y del polimorfismo Ile105Val *GSTP1* se encontró como alelo más frecuente a Val con un 62,28 % y el alelo Ile con 37,71 %. De los polimorfismos analizados en el gen *PON1* se encontraron las siguientes frecuencias: Leu55Met 92,3 % para el alelo Leu y 7,7 % para Met, Gln192Arg presentó 47,61 % para el alelo Gln y 52,39 % para Arg. Las frecuencias encontradas tanto para el grupo expuesto como para el no expuesto a plaguicidas no presentaron diferencias estadísticas significativas. En las personas expuestas a pesticidas se encontró un mayor porcentaje de obesidad en individuos con el alelo nulo de *GSTM1*, mientras que el alelo nulo de *GSTT1* se relacionó con niveles bajos de ICC y niveles altos de HDL en población no expuesta a pesticidas. El alelo Met del polimorfismo Leu55Met del gen *PON1* mostro relación con niveles altos de HDL, y en hombres se encontró relación de este alelo con valores significativamente más bajos de las enzimas hepáticas TGO, TGP y GGT en población no expuesta; en el mismo sentido, el alelo Arg del polimorfismo Gln192Arg mostró relación con valores más bajos de colesterol, HDL y lípidos totales en población general.

PALABRAS CLAVE: *Plaguicidas, polimorfismos, GSTM1, GSTT1, GSTP1, PON-1.*

ABSTRACT

ABSTRACT

Pesticides are one of the most widely used chemicals used by humans, with different health effects which may vary depending on the individual ability to metabolize them. The enzymes glutathione transferases and paraoxonases are important systems involved in the metabolism and detoxification of the organism. However, the presence of genetic variants could modify the detoxication capacity affecting the health of individuals. In the present study were evaluated polymorphisms of genes GSTM1, GSTT1, GSTP1 and PON-1, in 189 individuals from the town of Calvas, province of Loja – Ecuador; 121 exposed to pesticides and 68 not exposed, by Multiplex PCR, PCR-RFLPs and PCR- sequencing for genotypes.

The frequencies of the null alleles for GSTM1 and GSTT1 in the general population was 44.97 % and 48.51 % respectively, the polymorphism Ile105Val GSTP1 was found as a more frequent allele to Val with 62.28 % and the Ile allele with 37.71 %. The following frequencies were found in the polymorphisms analyzed in the gene PON1: Leu55Met 92.3 % for the allele Leu and 7.7 % for Met, Gln192Arg presented 47.61 % for the allele Gln and 57.67% for Arg. The frequencies found for both, the exposed and non-pesticide groups showed no significant statistical differences. In people exposed to pesticides, a higher percentage of obesity was found in individuals with the null allele of GSTM1, while the null allele of GSTT1 was related to low levels of ICC and high levels of HDL in the population not exposed to pesticides. The allele Met of the polymorphism Leu55Met gene PON1 showed relationship with high levels of HDL, and in men was found relationship of this allele with significantly lower levels of liver enzymes TGO, TGP and GGT in the population not exposed. At the same time, the Arg allele of Gln192Arg polymorphism showed a relationship with lower cholesterol, HDL and normal lipid profile values in the general population.

KEY WORDS: Pesticides, polymorphisms, GSTM1, GSTT1, GSTP1, PON-1.

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son unos de los químicos tóxicos utilizados en la agricultura y el hecho de que estos sean empleados en mezclas o simultáneamente con otros compuestos, hace que puedan tener diferentes efectos genotóxicos, aditivos, sinérgicos y potenciadores; además de tener acción mutagénica, también pueden estimular una acción carcinogénica y teratogénica. La variedad de complicaciones genotóxicas que pueden originarse depende de varios factores, dentro de los cuales se incluyen el ingrediente activo del compuesto, las impurezas, la ruta de absorción, los metabolitos originados, la duración y frecuencia de la exposición y la acumulación del plaguicida en diferentes tejidos (Lecourtois, 2013).

Los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de xenobióticos se agrupan en enzimas de fase I y II. Las enzimas de fase I se encargan de crear grupos polares a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, que en su mayoría son llevadas a cabo por las enzimas incluidas en membranas microsomales, denominadas citocromo P450, así como también las enzimas paraoxonasas y reductasas (Rodríguez y Rodeiro, 2014). Las enzimas de fase II catalizan reacciones en las que los grupos polares existentes en los xenobióticos o en sus metabolitos de fase I experimentan procesos de conjugación con moléculas endógenas de elevada polaridad como ácido glucurónico, glutatión o sulfatos, de las cuales destacan Glutathion S-transferasa, UDP-glucuroniltransferasa, sulfotransferasa, acetiltransferasa, metiltransferasa, entre otras. Tanto las enzimas de fase I como las de fase II tienen por objeto aumentar la hidrosolubilidad de los xenobióticos para facilitar su eliminación en medios acuosos, como son la bilis y la orina (Gago, 2016).

Las Glutathion S-transferasas (GST) comprende una gran variedad de proteínas citosólicas, mitocondriales y microsomales, capaces de realizar reacciones de conjugación con glutatión a una gran variedad de sustratos, tanto endógenos como exógenos. Actualmente, ocho clases distintas de GSTs se han descrito. GSTM1, GSTT1 y GSTP1 están involucradas en el metabolismo y desintoxicación de una amplia gama de compuestos, incluyendo xenobióticos, carcinógenos ambientales y quimioterápicos (Ferraz et al., 2014; Lecourtois, 2013; Martínez, 2014).

Por otro lado, la paraoxonasa (PON) es una glicoproteína dependiente de calcio, forma una familia de tres enzimas: PON-1, PON-2 y PON-3. La más estudiada es la Paraoxonasa-1, una arildialquilfosfatasa, investigada por su capacidad de hidrolizar *in vitro* diversos organofosforados, cuyo nombre deriva de uno de los sustratos artificiales más utilizados, el paraoxón, metabolito activo del insecticida paratión. PON-1 está involucrada en la

desintoxicación de fase I, en la cual los oxones de los organofosforados son sustratos para esta enzima, permitiendo su eliminación por hidrólisis (Fridman et al., 2011).

La exposición humana a mezclas de plaguicidas puede originar efectos biológicos y patológicos variables, puesto que la dosis efectiva de exposición a los plaguicidas que recibe un individuo depende no solo de la exposición ambiental inicial, sino también se ve influida por la capacidad innata de un individuo para metabolizar y excretar los plaguicidas específicos. Esta capacidad está parcialmente determinada por los genes que codifican para proteínas implicadas en estos procesos metabólicos. La variación genética o polimorfismos de estos genes probablemente conduce a la capacidad diferencial de metabolizar estas sustancias tóxicas, lo cual conlleva a la variabilidad en la susceptibilidad a los efectos de la exposición crónica (Márquez, 2015).

Existen estudios que evalúan genes polimórficos asociados a patologías o a una mayor susceptibilidad de padecerlas por la constante exposición a sustancias tóxicas, dentro de los cuales destacan los genes *GSTM1* y *GSTT1*, cuya delección o alelo nulo conlleva a la pérdida total de la actividad enzimática correspondiente y cuya presencia se ha asociado con enfermedades por estrés oxidativo y al desarrollo de ciertos tipos de cáncer (García et al., 2009). En este mismo sentido, el polimorfismo Ile105Val (rs1695) del gen *GSTP1* que consiste en un cambio de adenina (A) por guanina (G), origina el cambio de aminoácido isoleucina (Ile) por valina (Val) en la posición 105 de la proteína; este cambio se encuentra vinculado a enfermedades asociadas al desequilibrio oxidativo debido a la actividad ineficiente de esta enzima para la detoxificación (Chielle et al., 2016).

Estudios del gen *PON1* indican que los polimorfismos Met55Leu (rs854560) y Glu192Arg (rs662), que consisten en un cambio de timina (T) por A y de A por G, respectivamente, afectan la actividad paraoxonasa y por ende el metabolismo de los organofosforados, por lo cual individuos con riesgo de exposición podrían tener repercusiones en una intoxicación crónica (Fortunato et al., 2003; Zúñiga et al., 2015).

Por la participación que tienen estos genes en el metabolismo de plaguicidas se desarrolla el presente trabajo de investigación denominado: Evaluación de polimorfismos de genes detoxificadores Glutacion Transferasa *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y Paraoxonasa-1 *PON-1*, en trabajadores expuestos a plaguicidas del cantón Calvas, debido a que es una de las muchas poblaciones de escasos recursos situados en la ciudad de Loja – Ecuador, que viven del sustento de la agricultura, de manera que han estado expuestos a plaguicidas en donde la presencia de polimorfismos podría modular la capacidad de respuesta de los individuos a agentes tóxicos o enfermedades derivadas de esta exposición (Tirado et al., 2012).

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Plaguicidas

La Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (OMS y FAO, 2017) definen a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que permiten prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, e incluye todas las sustancias destinadas a regular el crecimiento de plantas, desecantes, defoliantes, agentes que permiten reducir la densidad de la fruta o que evitan la caída de ésta, así como también, sustancias que se aplican antes o después de la cosecha con el objetivo de proteger el producto contra el deterioro. Cabe recalcar que los plaguicidas no solo se usan en la agricultura, sino también se los incluye en la horticultura, en el sector forestal y en la ganadería.

1.1.1 Toxicidad de los plaguicidas.

Los plaguicidas entran en contacto con el hombre por diferentes vías, las mismas que pueden ser: oral, parenteral y por inhalación.

La toxicidad por vía oral se da por la ingestión errónea del producto, debido principalmente al mal almacenamiento y distribución del mismo (Pauletti, 1999). Los plaguicidas pueden ser deglutidos y pasar al tracto gastrointestinal, siguiendo hacia el sistema hepático y al circulatorio desde donde pueden ser eliminados; pero también puede ser devuelto por el sistema circulatorio hacia el hígado, pasando por la vía biliar y volver al tubo digestivo para ser eliminado, reabsorbido o bien, pasar a sitios de depósito (Lecourtois, 2013, p.17).

La vía parenteral “comprende distintas puertas de entrada, tales como la venosa, intraperitoneal, conjuntival, dérmica, muscular y subcutánea. En todas ellas el destino de la sustancia será el sistema circulatorio, para luego ser eliminada o depositarse en el organismo” (Lecourtois, 2013).

La exposición por vía inhalatoria puede ser causada por el trasvasar el producto en un ambiente cerrado sin la utilización de una mascarilla, “el tóxico ingresa por la vía aérea o pulmonar y de acuerdo con el tamaño y presión va a ser filtrado hasta los alvéolos, de donde puede pasar al torrente sanguíneo” (Lecourtois, 2013).

1.1.2 Clases de plaguicidas.

Los plaguicidas se pueden clasificar de diferentes formas considerando diferentes aspectos, Avivar *et al.* (2003) indican que las más frecuentes son las siguientes:

1.1.2.1 En cuanto a su acción preferente.

Estos productos, según su acción específica sobre la plaga o enfermedad que controlen (efecto biológico) reciben los nombres de: insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas,

nematocidas, rodenticidas, bactericidas, helicidas, algicidas, avicidas, larvicidas, ovicidas, pediculicidas, piscicidas, predicidas, silvicidas, termicidas, etc.

1.1.2.2 *En cuanto a su grado de toxicidad.*

Esta clasificación se hace atendiendo básicamente a su toxicidad aguda en función del riesgo para la salud, en la cual la OMS, basándose en su comportamiento tóxico en ratas y estimando la dosis letal media LD₅₀, indica lo siguiente:

Tabla 1: Clasificación según el grado de toxicidad

| OMS | | LD ₅₀ para la rata (mg/kg de peso corporal) | |
|------------|--|--|------------|
| | | Oral | Dérmica |
| Ia | Extremadamente peligroso | <5 | <50 |
| Ib | Altamente peligroso | 5-50 | 50 – 200 |
| II | Moderadamente peligroso | 50-2000 | 200-2000 |
| III | Ligeramente peligroso | 2000 | Más 2000 |
| U | No es probable que presente riesgo agudo | 5000 | O superior |

Fuente: World Health Organization, 2010

Elaborado por: World Health Organization, 2010

1.1.2.3 *Según su grupo químico.*

Es la de mayor interés sanitario, ya que los efectos sobre la salud humana son característicos y diferentes para cada uno de los grupos definidos. La OMS (1992) utilizó en sus publicaciones los siguientes grupos: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, bupiridilos, clorfenoxiacidos, cloro y nitrofenoles, organomercuriales.

A continuación, se indicarán solamente algunas familias de plaguicidas relevantes por el daño que causan a la salud y por su gran demanda de uso.

1.1.2.3.1 *Organoclorados.*

Son compuestos orgánicos, de bajo peso molecular, formados por moléculas de carbono, hidrógeno y cloro; estructuralmente se dividen en 3 grupos: los derivados clorados del etanol, ciclodienos y los derivados clorados del ciclohexano; estos se caracterizan por ser altamente tóxicos, bioacumulables y muy poco biodegradables (Avivar et al., 2003; Pierre y Betancourt, 2007).

Se absorben por vía digestiva, respiratoria y con menor frecuencia por vía cutánea, su amplio volumen de distribución se da por metabolismo hepático; estos compuestos no inhiben la colinesterasa, su principal efecto tóxico tiene lugar por la alteración de los mecanismos de transporte de Na^{1+} y K^{1+} en las membranas de los axones del Sistema Nervioso Central (SNC), debido a esto la excitabilidad de la membrana celular aumenta, facilitando la transmisión de impulsos nerviosos (Bataller, 2004).

Una interesante propiedad de los plaguicidas organoclorados es su capacidad de inducir enzimas hepáticas que intervienen en la biotransformación de xenobióticos, entre ellas las monooxigenasas (oxidasas de función mixta) y las transferasas. La consecuencia fisiológica de este proceso es un metabolismo más acelerado tanto de compuestos endógenos (hormonas esteroideas) como de xenobióticos (Avivar et al., 2003).

1.1.2.3.2 Organofosforados.

Son compuestos que tienen una estructura de éster (doble enlace P=O) y se derivan de los ácidos fosfórico y fosfínico; la vía accidental de penetración del tóxico es por lo general dérmica o respiratoria y eventualmente oral, debido a su alta liposolubilidad, pasan las barreras biológicas fácilmente, y por su volatilidad facilita su inhalación. Una vez absorbidos, los organofosforados se distribuyen rápidamente por todos los órganos y tejidos, aunque las concentraciones más elevadas se alcanzan en glándulas salivales, hígado y riñones, con mayor acumulación en el tejido graso (Avivar et al., 2003).

Las enzimas encargadas de su metabolismo son las esterasas, enzimas microsomales y transferasas siguiendo las dos fases habituales de detoxificación de los xenobióticos, proceso que fundamentalmente se da en el hígado, donde el compuesto sufre una serie de transformaciones químicas facilitando su excreción por vía renal (Márquez, 2015).

1.1.2.3.3 Carbamatos.

La mayor parte de ellos son derivados del ácido N-metilcarbámico, difieren de los insecticidas organoclorados por la ausencia de átomos de Cl⁻¹ y de los organofosforados por la ausencia de átomos de P⁻³. Están constituidos por tres tipos: los derivados de esteres carbonatados, comúnmente usados como insecticidas; los derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas; y los carbamatos propiamente dichos, que se emplean como herbicidas. Se absorben en el organismo por todas las vías, incluida la piel. Pasan rápidamente a sangre y se distribuyen a todos los tejidos sin acumularse. Pasan por distintas reacciones de degradación: N-demetilación, hidroxilación, O-dealquilación, sulfoxidación. Varios estudios han establecido que la hidroxilación alifática de las cadenas alquilo representa su ruta predominante de biotransformación oxidativa, algunas de estas reacciones fracasan en separar la unión éster dando lugar a inhibidores de las colinesterasas a veces más potentes que el producto primitivo. Los metabolitos finales entre los que se cuenta el CO₂ pueden integrarse en los tejidos o eliminarse por la respiración, leche y orina (Ferrer, 2003; Ramírez y Lacasaña, 2001; Avivar et al., 2003).

1.1.2.3.4 Bipyridilos.

Son herbicidas no selectivos que se usan principalmente en la agricultura y en el control de malas hierbas. Los más comercializados son el dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo y el 9,10-Dihidro-8a,10a-diazoniafenantreno dibromuro, ambos son rápidamente absorbidos por el tracto gastrointestinal, la absorción cutánea es muy débil, por esta vía el riesgo de intoxicación es despreciable salvo que exista una lesión cutánea previa o contacto prolongado que lesiona la piel y facilita su penetración sistémica. Una vez en el organismo, el tóxico se distribuye por la sangre, se fija en diversos tejidos (sobre todo en el pulmón) y ocasiona un cuadro grave con una mortalidad muy elevada. La toxicidad del dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo está relacionada con la generación de iones superóxido, que se combina con los lípidos insaturados de las membranas dando lugar a nuevos radicales libres en una reacción en cadena que conduce a la muerte celular con inflamación, edema e inducción de fibrosis (Ferrer, 2003; Centro de Información Toxicológica de Veracruz, 1958).

1.1.2.3.5 Piretrinas.

Son plaguicidas obtenidos por secado, molienda y pulverización de la flor del crisantemo, cuyo polvo contiene del 1 al 3 % del principio activo. Las principales piretrinas son las cinerinas I y II, las jasmolinas I y II, y las piretrinas I y II, consideradas estas últimas como las de efecto más potente; todas son metabolizadas por hidrólisis, oxidación y conjugación, con poca tendencia a acumularse en los tejidos. Además, son rápidamente degradados en el ambiente, pues, aunque se absorben masivamente por el suelo, se eliminan fácilmente con el agua; son los insecticidas más ampliamente usados en el ámbito doméstico donde han substituido casi totalmente al resto. Las moléculas de piretrinas son neuroactivas, de baja absorción dérmica, con un metabolismo rápido y no dejan residuos en la atmósfera; las de tipo I, causan descargas repetitivas en las fibras y terminales nerviosos, conduciendo a hiperexcitación. Las de tipo II, producen despolarización y bloqueo de la membrana nerviosa que conduce a la parálisis e inhiben la acción del GABA en su receptor. Su efecto fundamental se debe a una modificación en el canal del Na¹⁺ de la membrana nerviosa (Ramírez y Lacasaña, 2001; Ferrer, 2003).

1.2 Metabolismo de xenobióticos.

Los sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de xenobióticos se agrupan en enzimas de fase I y II. Las enzimas de fase I encargadas de crear grupos polares a través de reacciones de oxidación, reducción o hidrolisis, que en su mayoría son llevadas a cabo por las enzimas incluidas en membranas microsomales, denominadas citocromo P450, así como también las enzimas paraoxonasas y reductasas (Rodríguez y Rodeiro, 2014). Por otra parte, las enzimas de fase II en la que los grupos polares existentes en los xenobióticos o en sus metabolitos de fase I experimentan procesos de conjugación con moléculas

endógenas de elevada polaridad como ácido glucurónico, glutatión o sulfatos, de las cuales destacan glutatión transferasa, UDP-glucuroniltransferasa, sulfotransferasa, scetiltransferasa, metiltransferasa, entre otros. Tanto las enzimas de fase I como de fase II tienen por objeto aumentar la hidrosolubilidad de los xenobióticos para facilitar su eliminación en medios acuosos, como son la bilis y la orina (Gago, 2016).

1.3 Glutathion S-Transferasa (GST).

Las glutathion S-transferasas, son una familia de enzimas responsables del metabolismo de fase II de una amplia gama de xenobióticos y carcinógenos. Se encuentran en muchos tejidos y órganos de los cuales destacan: riñón, pulmones, intestino, piel, cerebro, corazón, sangre, musculo e hígado; en concentraciones elevadas se distribuyen en la fracción citosólica y en pequeñas cantidades en la fracción microsomal. Su masa molecular es de aproximadamente 25 kDa por subunidad, catalizan la unión de una molécula de glutathion (tripéptido intracelular antioxidante formado por ácido glutámico, cisteína y glicocola) con una amplia variedad de compuestos orgánicos, para formar un compuesto hidrosoluble que se excreta fácilmente por vía biliar, como se aprecia en la Figura 1 (Cascales y Rodés, 1990; Martínez, 2014; Hernández, 1995; Wilce y Parker, 1994)

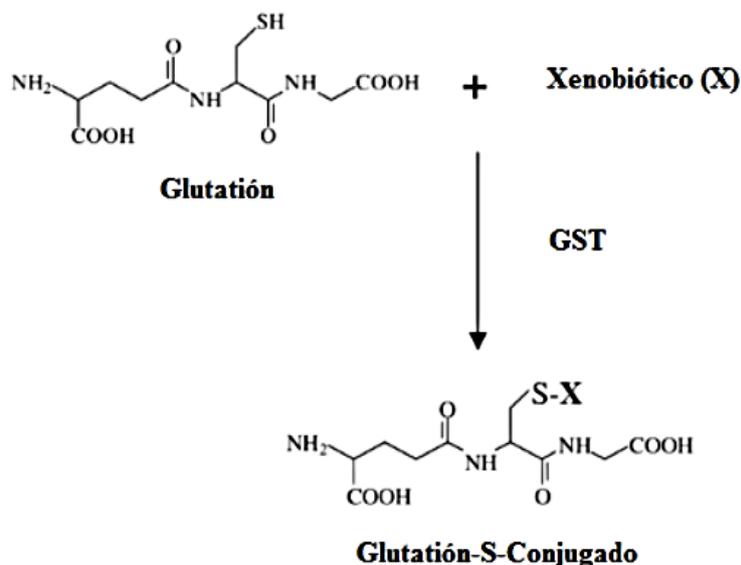


Figura 1: Reacción general de las Isoenzimas GST
Fuente: Martínez, 2014
Elaborado por: Martínez, 2014

En base a las similitudes de secuencias de aminoácidos y reactividades cruzadas de anticuerpos, las GST citosólicas de mamíferos se dividen en varias clases: α (alfa), μ (mu), κ (kappa), θ (theta), π (pi), Ω (omega) y ζ (zeta); además, hay una clase de GST microsomal. Cada clase está codificada por un solo gen o una familia de genes (Kniffin,

2007), de las cuales las clases θ , μ y π son las más ampliamente estudiadas a nivel poblacional.

Cada unidad de GST está constituido por dos extremos: N-terminal y C-terminal. Figura 2. En general, las GST contienen dos lados de unión: el sitio de unión a GSH conservado (sitio G) y el sitio de unión electrófila (sitio H), que es muy variable en diferentes clases de GST citosólicas; con la finalidad de que se dé la conjugación y de esta manera la detoxificación del xenobiótico (Bonola et al., 2014; Bräutigam et al., 2015).

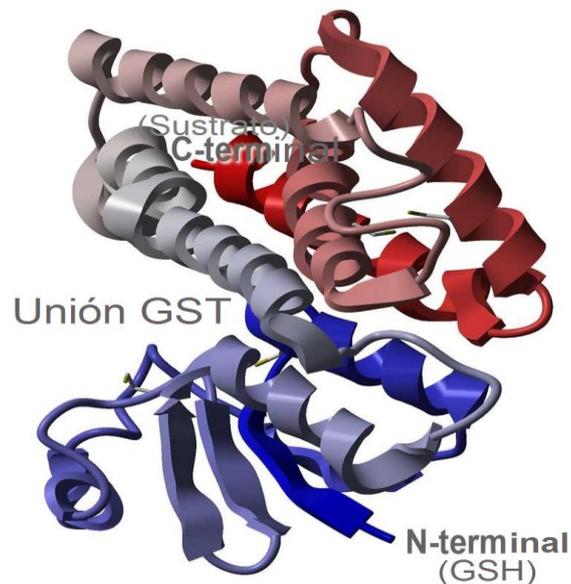


Figura 2: Estructura de Glutation transferasa

Fuente: Rungrutai et al., 2005

Elaborado por: Rungrutai et al., 2005

1.3.1 GSTM1.

Pertenece a los genes de la clase μ (mu) que se encuentran expresados en varios tejidos; participan en la detoxificación de xenobióticos, carcinógenos, toxinas ambientales, drogas terapéuticas, productos de estrés oxidativo por conjugación con glutatión. El gen *GSTM1* se encuentra situado en el cromosoma 1, formado por 8 exones y delimitado por dos regiones idénticas de 4,2 Kb. Existen cuatro variantes alélicas: A, B, C y 0 (alelo nulo), los tres primeros alelos son activos mientras que el alelo 0 es inactivo, es decir no se produce la síntesis de la enzima debido a que presenta una deleción homocigota (Leiro et al., 2008; Martínez, 2014; Varela, 2009).

El polimorfismo *GSTM1* nulo es frecuente en humanos, alrededor del 50 % con diferencias para distintos grupos étnicos (Leiro, 2008). Estudios en poblaciones europeas y africanas presentan la deleción del gen en un rango de 49 – 55 % y de 28 – 44 %, respectivamente; en poblaciones asiáticas del 23 – 52 % y en poblaciones amerindias del 4 – 43% (Piacentini et al., 2011; Gaspar et al., 2002).

Un estudio realizado sobre polimorfismos genéticos de *GSTM1* y *GSTT1* como modificadores de riesgo mutagénico en agricultores bolivianos expuestos a plaguicidas indican que la asociación entre polimorfismos de las GSTs y daño genotóxico, muestra que la población con ausencia del *GSTM1* incrementa el riesgo de 0.38 veces más de presentar daño genotóxico en relación a la población que tiene el gen (Tirado, Ascarrunz, Aguilar y Rada, 2012).

1.3.2 GSTT1.

Pertenece a los genes de la clase theta ubicado en el cromosoma 22. Su producto cataliza la desintoxicación de oxígeno reactivo y los productos de la peroxidación lipídica, por esta razón la inactividad enzimática de *GSTT1* se relaciona con una mayor exposición al estrés oxidativo (Mendonça et al., 2016).

El alelo nulo del gen *GSTT1* puede encontrarse en un 30 % de la población; 37 – 47 % en África; 28 % en Europa; de 14 – 51 % en poblaciones asiáticas, y de 0 – 30 % en poblaciones amerindias (Piacentini et al., 2011; Gaspar et al., 2002).

Pinhel et al. (2013) sugieren una relación entre la enfermedad de Parkinson y la exposición previa a pesticidas, efecto que puede verse aumentado en personas con genotipo nulo para *GSTM1* y *GSTT1*. En un estudio realizado en agricultores expuestos a pesticidas, se pudo determinar que la delección homocigotica de *GSTT1* o *GSTM1* puede desempeñar un papel modulador en la salud de los trabajadores con exposición prolongada a pesticidas (Ahluwalia y Kaur, 2018).

1.3.3 GSTP1.

GSTP1 se encuentra situado en el cromosoma 11, y se expresa ampliamente en tejidos extrahepáticos como pulmones y el esófago, además, se ha demostrado que se encuentra expresado de forma importante en tejidos malignos. Este gen presenta polimorfismos de cambio de un solo nucleótido (SNP) que afecta la función de la actividad enzimática como el rs1695 Ile105Val (Li et al., 2010).

El polimorfismo rs1695 Ile105Val presenta diferencias en las frecuencias del alelo Val según la población, así, para poblaciones africanas 34 %, europeas 31 % y asiáticas 22 % (Sharma et al., 2014)

Según Saad-Hussein et al. (2017) se indica que los individuos con el genotipo Ile105Ile de *GSTP1* mostraron mayor daño en el ADN, medido por ensayo cometa respecto de los otros genotipos, en trabajadores expuestos a mezclas de pesticidas.

1.4 Paraoxonasa.

La paraoxonasa (PON) es una glicoproteína dependiente de Ca^{2+} compuesta por 354 aminoácidos con 44 kDa y forma una familia de tres enzimas: PON-1, PON-2 y PON-3; la más estudiada es la Paraoxonasa-1 (PON-1), una arildialquilfosfatasa que fue investigada por su capacidad de hidrolizar *in vitro* diversos organofosforados.

PON-1 es sintetizada en el hígado y está codificada por el gen *PON1* que se encuentra junto a *PON2* y *PON3* en el cromosoma 7 (Márquez, 2015).

Estructuralmente PON1 presenta dos sitios activos funcionales, uno donde se catalizan las reacciones de paraoxonasa/arilesterasa y el otro para la protección contra la oxidación de las lipoproteínas, el cual se mantiene unido a las HDL por interacciones hidrofóbicas entre la región N-terminal de la enzima, los fosfolípidos y las apolipoproteínas de las lipoproteínas, Figura 3 (Canales y Sánchez-Muniz, 2013).

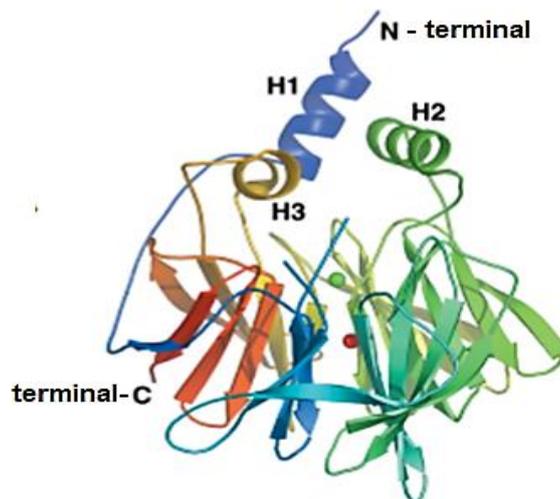


Figura 3: Estructura general de PON1

Fuente: Harel et al., 2004

Elaborado por: Harel et al., 2004

PON1 hidroliza diferentes compuestos dentro de los cuales están los metabolitos de oxón, compuesto de varios pesticidas organofosforados como O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotioato, O,O-Dietil-O-4-nitrofenil-tiofosfato y O, O-dietil O-3,5,6-trichloropyridin-2-il fosforotioato; agentes nerviosos como metilfosfonofluoridato de O-isopropilo y metilfosfonofluoridato de O-pinacolilo; ésteres aromáticos como ácido acético; lactonas aromáticas y alifáticas; además, cataliza la reacción inversa y lactonización de ácidos gamma y delta-hidroxicarboxílicos (Draganov et al., 2005). Joven y Camps (2007) afirman que PON1 circula en el plasma unido como una apoproteína a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), y se empezó a relacionar con la arteriosclerosis y la enfermedad cardiovascular por su capacidad de hidrolizar los fosfolípidos oxidados presentes en las

lipoproteínas de baja densidad (LDL), asociándose, por tanto, a los efectos beneficiosos o ateroprotectores de las HDL.

El gen presenta dos polimorfismos importantes: Met55Leu (rs854560) y Gln192Arg (rs662). Estudios indican que el polimorfismo en la posición 55 se presenta en población mexicana en un 94 % para Met y 6 % para el alelo Leu, y el polimorfismo en la posición 192 se muestra en la misma población con una frecuencia del 40 % para Gln y 60 % para Arg. En población europea (López-Flores et al., 2009). La distribución de frecuencias para estos polimorfismos es la siguiente: para Met55Leu, 39 % para Met y 61 % para Leu, y para Gln192Arg, 75 % para Gln y 25 % para Arg (Ferré et al., 2002). Para población asiática la frecuencia de Met55Leu se presenta en un 4 % para Met y 96 % para Leu, y 72 % para Gln y 28 % para Arg del polimorfismo Gln192Arg (Shin, Oh, Kim, y Kim, 2008).

PON1 juega un papel protector en la toxicidad de los organofosforados y, debido a su capacidad antioxidante, también se ha relacionado con la enfermedad cardiovascular, conjugando en estas relaciones el efecto de los polimorfismos y de factores ambientales que pueden modular su actividad y posibles consecuencias toxicológicas y clínicas (Costa et al., 2005).

Según el estudio realizado por Eskenazi et al. (2014) el genotipo y los niveles enzimáticos de PON1 podrían relacionarse directamente con el rendimiento en ciertos dominios del neurodesarrollo en niños en edad escolar, posiblemente los niveles más bajos de enzima PON1 materna durante el embarazo también pueden aumentar la susceptibilidad de los niños a la neurotoxicidad de la exposición a plaguicidas organofosforados.

Posiblemente la participación del sistema de desintoxicación humano esté relacionado con diversas manifestaciones de salud, especialmente en poblaciones expuestas a compuestos tóxicos como los plaguicidas (Tsatsakisa et al., 2009).

CAPITULO II. MÉTODOS

2.1 Fin del proyecto:

Aportar con conocimientos sobre los biomarcadores como herramientas de pronóstico y/o prevención de enfermedades, mejorando la calidad de vida de las personas expuestas a ciertos xenobióticos.

2.2 Propósito del proyecto:

Evaluar los biomarcadores de susceptibilidad o polimorfismos genéticos de las Glutation Transferasa: *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*; y Paraoxonasa-1 *PON1*, en trabajadores expuestos a plaguicidas del cantón Calvas de la provincia de Loja - Ecuador.

2.3 Componentes del proyecto:

Calcular la frecuencia de alelos nulos de los genes *GSTM1* y *GSTT1*, la frecuencia alélica del polimorfismo rs1695 (Ile105Val) del gen *GSTP1* y los polimorfismos rs854560 (Leu55Met) y rs662 (Gln192Arg) del gen *PON1* en personas expuestas y no expuestas a plaguicidas del cantón Calvas.

Determinar la correlación entre los polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *PON-1* y parámetros bioquímicos y/o hematológicos de la población analizada.

2.4 Tipo de Estudio:

El presente es un estudio caso control de tipo observacional-transversal, con el fin de determinar la frecuencia de polimorfismos de los genes *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* y *PON1*, y evaluar su relación con parámetros bioquímicos y/o hematológicos en personas expuestas a plaguicidas del cantón Calvas.

2.5 Población:

El análisis se realizó a partir de 189 muestras de sangre periférica que fue recolectada previa autorización mediante la firma de un consentimiento informado según los reglamentos del Comité de Ética de la Universidad San Francisco de Quito. Las muestras fueron obtenidas de donantes expuestos y no expuestos a plaguicidas en un número de 121 y 68, respectivamente.

2.6 Parámetros bioquímicos, hematológicos y antropométricos:

Los parámetros bioquímicos y hematológicos que se determinaron fueron: glucosa, urea, creatinina, colesterol, triglicéridos, lípidos totales, lipoproteína de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL), transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP), gama glutamil transpeptidas (GGT) y biometría hemática que incluyó leucocitos, eritrocitos, plaquetas, hematocrito y hemoglobina; además,

se incluyeron datos antropométricos como peso (Kg), talla (m), cintura y cadera (cm), con la finalidad de obtener índice de masa corporal (IMC) e índice de cintura cadera (ICC).

2.7 Análisis genético:

La extracción de ADN se realizó mediante el kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (PROMEG, USA) el cual consta de una fase de lisis celular seguida de una lisis nuclear, precipitación de proteínas y una fase de purificación del material genético. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría usando el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), el cual indica valores de concentración y pureza del ADN.

2.7.1 Detección de alelos nulos de los genes *GSTM1*, *GSTT1*:

Los alelos nulos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se analizaron mediante la técnica de PCR multiplex, donde se utilizaron reactivos Platinum® Multiplex PCR Master (Applied Biosystem, USA), la cual permite la determinación de más de una secuencia en una sola reacción. Se emplearon primers específicos para *GSTM1* (5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAG-3' y 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'), *GSTT1* (5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3' y 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3') según lo indicado por Sandoval et al. (2014). Como control interno se utilizó β -globina (5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3' y 5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3').

La amplificación se realizó utilizando un termociclador Applied Biosystems SimpliAmp (LIFE TECHNOLOGIES-THERMO FISHER SCIENTIFIC) con el siguiente protocolo: desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguidas de 30 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 1 min, y 72 °C durante 30 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los fragmentos de ADN amplificados se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, determinándose los alelos nulos por la ausencia de amplicón (*GSTM1*: 219pb, *GSTT1*: 459pb y β -globina: 167pb), según lo descrito en la Figura 4.

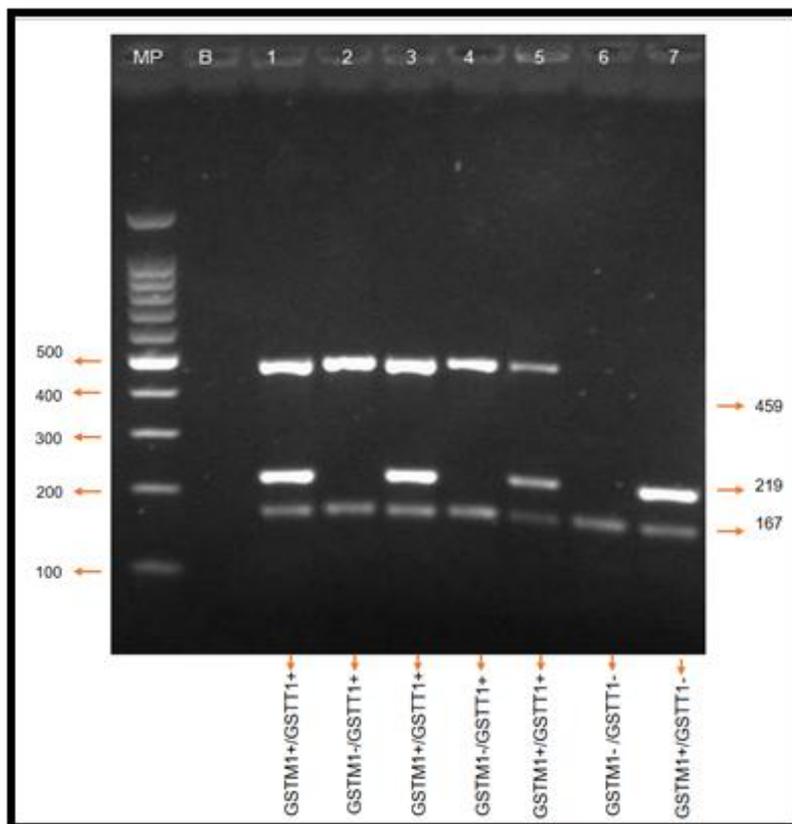


Figura 3: Fragmentos amplificados de los genes *GSTM1*, *GSTT1*

La ilustración muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2 %, de los fragmentos amplificados de *GSTM1*, *GSTT1* y control interno. MP = marcador de peso molecular de 100pb; B = blanco; 1 – 7 = muestras.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

2.7.2 Detección de polimorfismo Ile105Val del gen *GSTP1*:

El polimorfismo rs1695 (Ile105Val) del gen *GSTP1* fue analizado mediante PCR y Fragmentos de restricción (PCR-RFLP), empleándose primers específicos (5'-GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG-3' y 5'-AGCCACCTGAGGGGTAAG-3') según lo descrito por Sailaja, et al. (2010).

Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, anillamiento a 58.4 °C durante 30 segundos, extensión a 72 °C por 30 segundos, por 30 ciclos y extensión final a 72 °C durante 7 min. La digestión se realizó con la enzima BsmA1 (Thermo Fisher Scientific, USA) según las indicaciones del fabricante.

La determinación de los genotipos se realizó según el patrón de bandas obtenido, así: A/A si se presentan bandas de 329 y 107pb, A/G con bandas de 329, 216 y 107 pb, y G/G 216 y 107; Figura 5.

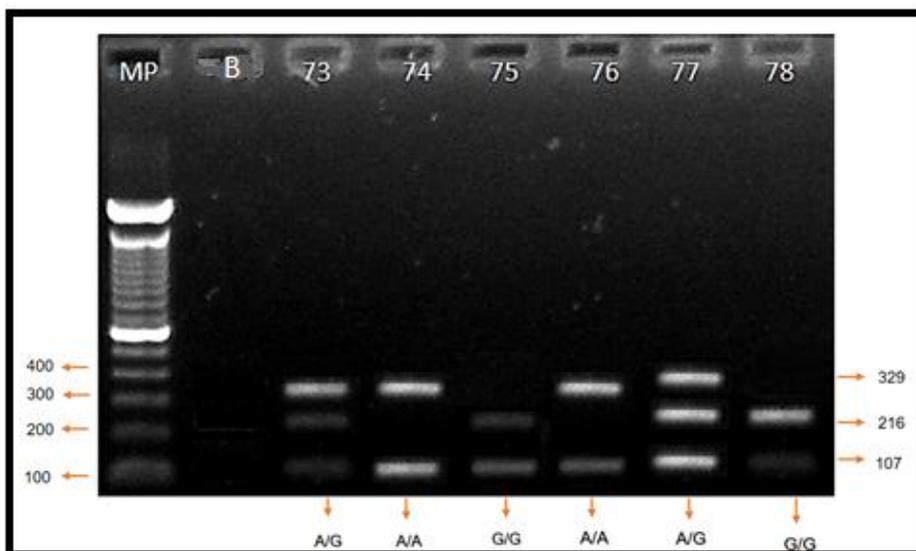


Figura 4: PCR-RFLPs con enzima de restricción BSMA1.

La ilustración muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2 %, de los fragmentos amplificados de *GSTP1*. MP = marcador de peso molecular de 100pb; B = blanco; 73 – 78 = muestras.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

2.7.3 Detección de polimorfismos del gen *PON1*:

La determinación de los polimorfismos rs854560 (Leu55Met) y rs662 (Gln192Arg) del gen *PON-1* se determinaron mediante la técnica de PCR-secuenciación, en este proceso primeramente se amplificaron fragmentos específicos correspondientes a los exones 3 (5'-TGGATCCACATCCTGCAATA-3' y 5'-TTGAAAGTGGGCATGGGTAT-3') y 6 (5'-CCTGTAATGTTCAATACCTTCACC-3' y 5'-TCCACTACATTTTCAGAGAGTTCACA-3') mediante primers específicos diseñados con el programa Primer 3 V0.4.0, empleando reactivos Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (2X) (Invitrogen, USA); con el siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min, 35 ciclos que consistieron de una desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, anillamiento a 53 °C para cada uno, respectivamente, por 1 min y una extensión a 72 °C por 30 segundos; concluyendo con una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos fueron analizados en gel de agarosa al 2 %. Seguido se realizó la secuenciación empleando reactivos BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit y BigDye XTerminator™ ® Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) empleando el equipo 3500 Genetic Analyzer for Resequencing & Fragment Analysis (Applied Biosystems, USA). Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa CodonCode Aligner, asignándose los genotipos según el electroferograma como se indica en la Figura 6 (A); (B) y Figura 7 (A); (B).

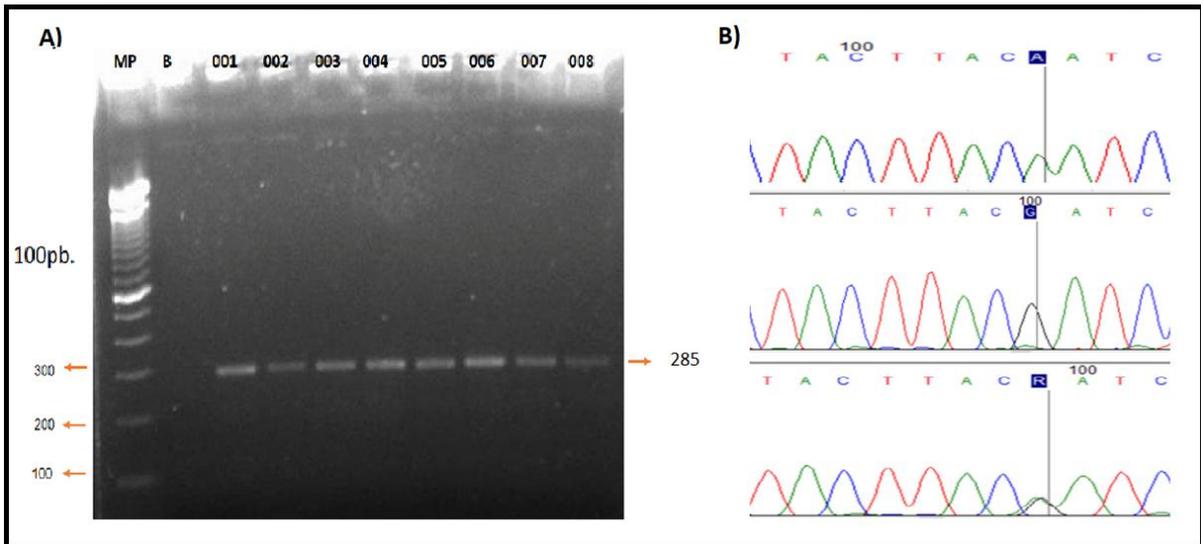


Figura 5: Fragmentos amplificados del Gen *PON1* (Gln192Arg) y electroferograma.

A) La ilustración muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2 %, de los fragmentos amplificados de *PON1* (Gln192Arg). MP = marcador de peso molecular de 100pb; B = blanco. 001 – 008 = muestras. B) resultados de secuenciación del exón 6. Electroferogramas de homocigoto silvestre AA, homocigoto GG y heterocigoto AG.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

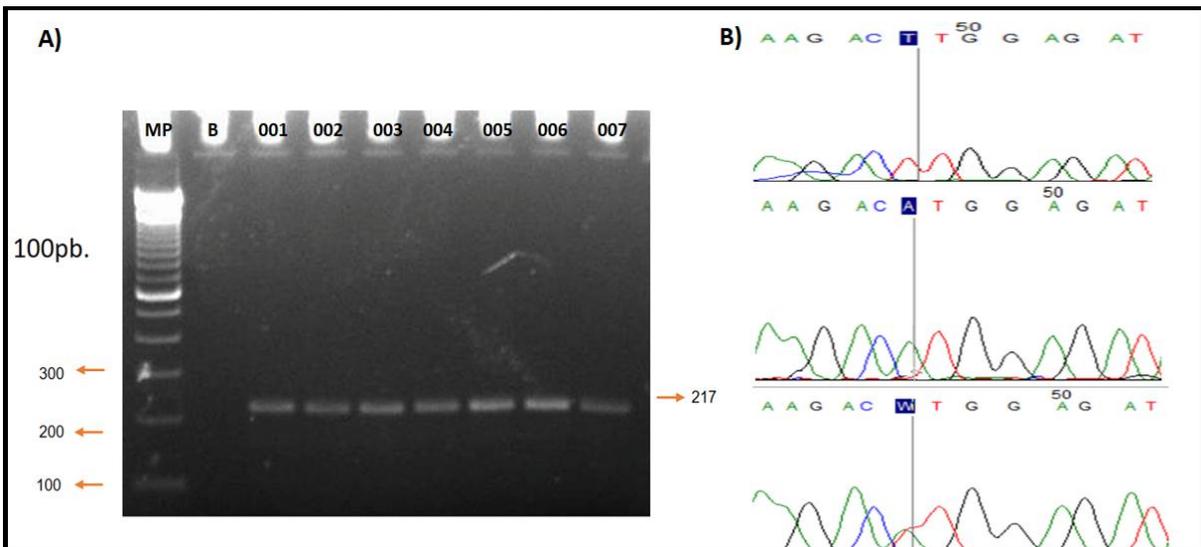


Figura 6: Fragmentos amplificados del Gen *PON1* (Leu55Met) y electroferograma

A) La ilustración muestra la electroforesis en gel de agarosa al 2 %, de los fragmentos amplificados de *PON1* (Leu55Met). MP = marcador de peso molecular de 100pb; B = blanco. 001 – 007 = muestras. B) resultados de secuenciación del exón 3. Electroferogramas de homocigoto silvestre TT, homocigoto AA y heterocigoto TA.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

2.8 Análisis estadístico

El análisis de resultados se lo realizó mediante estadística descriptiva para los datos generales de la población, se determinaron frecuencias alélicas, genotípicas y equilibrio de

Hardy Weinberg. Las diferencias de los parámetros bioquímicos y/o hematológicos se revisaron usando pruebas no paramétricas usando el paquete estadístico SPSS v23.0. Valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

3.1.1 Características generales de la población:

Se incluyeron un total de 189 individuos, 68 no expuestos y 121 expuestos a plaguicidas. Las principales características antropométricas, bioquímicas y hematológicas descritas según la media y desviación estándar para los dos grupos de estudio por género se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Parámetros antropométricos, bioquímicos y hematológicos de la población estudiada.

| Parámetros | Expuestos 121 | | | | No expuestos 68 | | | | Valores de referencia OMS |
|-----------------------------------|------------------|----------|----------------|----------|--------------------|----------------------|----------------|-----------|------------------------------------|
| | Masculino 44 | | Femenino 77 | | Masculino 14 | | Femenino 54 | | |
| Antropométricos | | | | | | | | | |
| Edad (años) | 53,82 | ± 17,38 | 50,99 | ± 16,12 | 50,86 | ± 15,76 | 43,37 | ± 14,03* | |
| Peso (kg) | 60,37 | ± 8,44 | 57,43 | ± 10,01 | 77,94 | ± 18,38 ⁺ | 63,13 | ± 11,99* | |
| Talla (m) | 1,58 | ± 0,06 | 1,47 | ± 0,05 | 1,68 | ± 0,08 ⁺ | 1,52 | ± 0,06* | |
| PAS (mm Hg) | 136,8 | ± 23,82 | 130,5 | ± 26,03 | 122,9 | ± 24,27 ⁺ | 116,24 | ± 25,03* | < 120mmHg |
| PAD (mm Hg) | 74,05 | ± 9,33 | 74,48 | ± 14,44 | 75,43 | ± 10,39 | 72,52 | ± 8,07 | < 80mmHg |
| IMC (kg/m ²) | 24,05 | ± 2,45 | 26,41 | ± 4,05 | 27,44 | ± 4,91 ⁺ | 27,43 | ± 5 | <25,0 kg/m ² |
| ICC | 0,92 | ± 0,08 | 0,91 | ± 0,13 | 0,96 | ± 0,03 ⁺ | 0,87 | ± 0,11 | M: 0,78 – 0,94 F: 0,71– 0,84 |
| Obesidad % | 0% | | 6,34% | | 1,05% ⁺ | | 7,93% | | |
| Bioquímicos | | | | | | | | | |
| Glucosa (mg/dL) | 75,99 | ± 12,23 | 85,55 | ± 35,56 | 108,2 | ± 54,1 ⁺ | 87,42 | ± 24,78 * | < 110 mg/dL |
| Colesterol (mg/dL) | 219,8 | ± 46,94 | 214,7 | ± 57,77 | 232 | ± 48,7 | 223,31 | ± 52,34 | < 200 mg/dL |
| Triglicéridos (mg/dL) | 153,1 | ± 127,37 | 185,5 | ± 203,76 | 194,4 | ± 135 | 140,41 | ± 94,75* | <150 mg/dL |
| HDL (mg/dL) | 72,63 | ± 63,81 | 58,01 | ± 11,67 | 35,49 | ± 9,3 ⁺ | 53,36 | ± 17,95* | M>40; F>50 |
| LDL (mg/dL) | 129,1 | ± 40,93 | 119,8 | ± 46,04 | 157,6 | ± 38,22 ⁺ | 140,95 | ± 51,79* | < 100 mg/dL |
| Lípidos Totales (mg/dL) | 592,8 | ± 178,94 | 614,9 | ± 282,5 | 658,4 | ± 208,1 | 586,67 | ± 166,21 | 450 – 800 mg/dL |
| Urea (mg/dL) | 33,5 | ± 9,01 | 30,37 | ± 9,24 | 36,25 | ± 9,7 | 29,69 | ± 7,91 | 15 a 45 mg/dL |
| Creatinina (mg/dL) | 0,93 | ± 0,13 | 0,8 | ± 0,09 | 1,12 | ± 0,14 ⁺ | 0,88 | ± 0,12* | M: 0,7 - 1,4 F: 0,6 - 1,1 mg/dL |
| TGO (UI/L) | 32,75 | ± 12,38 | 36,52 | ± 27,2 | 29,71 | ± 15,71 | 25,7 | ± 10,08* | 10-40 U/I |
| TGP (UI/L) | 27,98 | ± 10,95 | 34,96 | ± 41,12 | 21,29 | ± 14,8 ⁺ | 20,46 | ± 15,61* | 7-40 U/I |
| GGT (UI/L) | 42,86 | ± 32,75 | 38,48 | ± 66,17 | 37,21 | ± 37,68 | 27,87 | ± 35,47* | 6 - 50 U/I |
| Hematológicos | | | | | | | | | |
| Leucocitos (10 ³ /μL) | 6,07 | ± 1,34 | 6,78 | ± 1,49 | 6,99 | ± 1,86 ⁺ | 7,52 | ± 2,02 | 4-11 mil/μL |
| Eritrocitos (10 ⁶ /μL) | 5,19 | ± 0,61 | 4,77 | ± 0,4 | 5,43 | ± 0,27 | 4,64 | ± 0,41 | F: 4,8 ; M: 5,5 millones/μL |
| Hemoglobina (g/dL) | 15,79 | ± 1,08 | 14,29 | ± 1,04 | 16,18 | ± 0,9 | 13,62 | ± 1,10* | F: 14±2; M:16±2 g/dL |

| | | | | | |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|----------------------|
| Hematocrito % | 45,96 ± 2,95 | 41,9 ± 2,9 | 46,61 ± 2,35 | 39,95 ± 3,05* | F: 42 ±5; M: 47 ±6 % |
| Plaquetas (10³/μL) | 254,1 ± 54,67 | 264,6 ± 62,77 | 251,6 ± 40,75 | 296,35 ± 68,22* | 150 -400mil/μL |

PAS: Presión arterial sistólica, PAD: Presión arterial diastólica, IMC: Índice de masa corporal, ICC: índice cintura cadera. *Valor de p<0.05 calculado mediante U de Mann-Whitney entre mujeres expuestas y no expuestas. †Valor de p<0.05 calculado mediante U de Mann-Whitney entre hombres expuestos y no expuestos.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

A continuación, se presenta el análisis de los resultados de las frecuencias de los distintos polimorfismos y su distribución por población general y de acuerdo al grupo sin exposición y con exposición a plaguicidas.

3.1.2 Frecuencias de alelos nulos de *GSTM1* y *GSTT1*:

En las Tabla 3 y Tabla 4 se presenta la distribución de la delección de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en población general y considerando los grupos expuestos y no expuestos, en los cuales no se encontró diferencias estadísticas en las frecuencias.

Tabla 3: Frecuencia de alelos nulos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en población general.

| Gen | Genotipo | f | % |
|--------------|----------|-----|-------|
| <i>GSTM1</i> | Presente | 104 | 55,02 |
| | Ausente | 85 | 44,97 |
| <i>GSTT1</i> | Presente | 98 | 51,85 |
| | Ausente | 91 | 48,15 |

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Tabla 4: Frecuencia de alelos nulos de los genes *GSTM1* y *GSTT1* en expuestos y no expuestos.

| Gen | Genotipo | EXPUESTOS (121) | | NO EXPUESTOS (68) | |
|--------------|----------|-----------------|-------|-------------------|-------|
| | | f | % | F | % |
| <i>GSTM1</i> | Presente | 73 | 60,33 | 31 | 45,68 |
| | Ausente | 48 | 39,66 | 37 | 54,41 |
| <i>GSTT1</i> | Presente | 60 | 49,58 | 38 | 55,88 |
| | Ausente | 61 | 50,41 | 30 | 44,11 |

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

3.1.3 Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo rs1695 (Ile105Val) del gen *GSTP1*

Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ile105Val del gen *GSTP1* se muestran en las Tabla 5 y Tabla 6 para población general y considerando expuestos y no expuestos, respectivamente.

El genotipo más frecuente fue Ile/Val y el alelo más frecuente fue Val con 62,86 %. La distribución de frecuencias genotípicas no muestra diferencias estadísticas al considerar los grupos expuestos y no expuestos.

Tabla 5: Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ile105Val del gen *GSTP1*.

| | Genotipos | f | % |
|---------------|------------------|---------|-------|
| | Ile105Val | Ile/Ile | 11 |
| Ile/Val | | 107 | 62,57 |
| Val/Val | | 53 | 30,91 |
| Alelos | | | |
| | Ile | 129 | 37,71 |
| | Val | 213 | 62,28 |

Muestras analizadas: 171

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Tabla 6: Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Ile105Val del gen *GSTP1* en expuestos y no expuestos.

| Genotipos | EXPUESTOS 106 | | NO EXPUESTOS 65 | |
|------------------|------------------|-------|--------------------|-------|
| | f | % | f | % |
| Ile/Ile | 4 | 3,77 | 7 | 10,76 |
| Ile/Val | 67 | 63,20 | 40 | 61,53 |
| Val/Val | 35 | 33,03 | 18 | 27,69 |
| Ile105Val | | | | |
| Alelos | | | | |
| Ile | 75 | 35,38 | 54 | 41,54 |
| Val | 137 | 64,62 | 76 | 58,46 |

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

3.1.4 Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs854560 (Leu55Met) y rs662 (Gln192Arg) del gen *PON1*

Los genotipos encontrados para el polimorfismo Leu55Met fueron: Leu/Leu, Leu/Met, Met/Met, siendo el más frecuente el genotipo homocigoto silvestre Leu/Leu y el alelo más frecuente Leu. Mientras que para el polimorfismo Gln192Arg los genotipos encontrados fueron: Gln/Gln, Gln/Arg, Arg/Arg, de los cuales el genotipo más frecuente fue heterocigoto Gln/Arg y el alelo con mayor porcentaje fue Arg. (Tabla 7, Tabla 8). La distribución de frecuencias en expuestos y no expuestos no mostró diferencias estadísticas.

Tabla 7: Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos Leu55Met y Gln192Arg del gen *PON1*.

| Polimorfismos <i>PON1</i> | | f | % |
|---------------------------|------------------|-----|-------|
| Leu55Met | Genotipos | | |
| | Leu/Leu | 163 | 86,24 |
| | Leu/Met | 23 | 12,17 |
| | Met/Met | 3 | 1,59 |
| | Alelos | | |
| | Leu | 349 | 92,3 |
| | Met | 29 | 7,7 |
| Gln192Arg | Genotipos | | |
| | Gln/Gln | 35 | 18,52 |
| | Gln/Arg | 90 | 47,62 |
| | Arg/Arg | 64 | 33,86 |
| | Alelos | | |
| | Gln | 180 | 47,61 |
| | Arg | 218 | 57,67 |

Fuente: Autor
Elaborado por: Autor

Tabla 8: Frecuencias genotípicas de los polimorfismos Leu55Met y Gln192Arg del gen *PON1* según el grupo expuestos y no expuestos.

| Polimorfismo <i>PON1</i> | EXPUESTOS | | NO EXPUESTOS | | |
|--------------------------|------------------|-----|--------------|-----|-------|
| | 121 | | 68 | | |
| | f | % | f | % | |
| Leu55Met | Genotipos | | | | |
| | Leu/Leu | 114 | 94,21 | 49 | 72,05 |
| | Leu/Met | 6 | 4,95 | 17 | 25 |
| | Met/Met | 1 | 0,82 | 2 | 2,94 |
| | Alelos | | | | |
| | Leu | 234 | 96,69 | 115 | 84,55 |
| | Met | 8 | 3,3 | 21 | 15,44 |
| Gln192Arg | Genotipos | | | | |
| | Gln/Gln | 16 | 13,22 | 19 | 27,94 |

| | | | | | |
|------------------|---------|-----|-------|----|-------|
| Gln192Arg | Gln/Arg | 64 | 52,89 | 26 | 38,23 |
| | Arg/Arg | 41 | 33,88 | 23 | 33,82 |
| Alelos | | | | | |
| | Gln | 96 | 39,66 | 64 | 47,05 |
| | Arg | 146 | 60,33 | 72 | 52,94 |

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

En los siguientes apartados se presentan las tablas donde se observa la correlación de los polimorfismos de los distintos genes estudiados con parámetros antropométricos y bioquímicos en la población del cantón Calvas de forma general, por grupo de exposición y por género, según valores significativos. Se han probado los diferentes modelos, aditivo, dominante y recesivo para los SNP. No se incluyen datos que no presenten valores significativos.

3.1.5 Correlación entre la delección de los genes *GSTM1* y *GSTT1* y parámetros antropométricos y bioquímicos de la población analizada.

En la población analizada se encontró que la delección de *GSTM1* se mostró en relación con el porcentaje de obesidad, especialmente en el grupo expuesto a pesticidas Tabla 9.

Tabla 9: Alelo nulo de *GSTM1* y características antropométricas en el grupo expuesto y no expuesto.

| Parámetros | ESTADO | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------|---------|-----------------|---------|--------|------------------|--------|-----------------|--|--|
| | EXPUESTOS | | | | | NO EXPUESTOS | | | | |
| | PRESENTE (74) | | AUSENTE (47) | | | PRESENTE (34) | | AUSENTE (34) | | |
| Antropométricos | | | | | | | | | | |
| Edad (años) | 50,54 | ± 17,23 | 54,34 | ± 15,38 | 46,41 | ± 16,47 | 43,58 | ± 12,81 | | |
| Peso (Kg) | 58,82 | ± 8,54 | 58,00 | ± 11,01 | 64,83 | ± 13,63 | 67,38 | ± 15,66 | | |
| Talla (m) | 1,52 | ± 0,08 | 1,49 | ± 0,07 | 1,55 | ± 0,10 | 1,55 | ± 0,09 | | |
| PAS (mm Hg) | 130,33 | ± 23,08 | 136,53 | ± 28,35 | 113,19 | ± 26,62 | 121,53 | ± 22,79 | | |
| PAD (mm Hg) | 73,74 | ± 12,46 | 75,23 | ± 13,40 | 72,22 | ± 7,63 | 73,92 | ± 9,41 | | |
| IMC (kg/m²) | 25,28 | ± 2,91 | 25,98 | ± 4,72 | 26,71 | ± 4,45 | 28,07 | ± 5,32 | | |
| ICC | 0,92 | ± 0,13 | 0,90 | ± 0,08 | 0,90 | ± 0,06 | 0,88 | ± 0,13 | | |
| Obesidad % | 5,4 | | 17* | | | 18,8 | | 30,6 | | |

Los datos corresponden a medias ± desviación estándar (SD). PAS: Presión arterial sistólica, PAD: Presión arterial diastólica, IMC: Índice de masa corporal, ICC: índice cintura cadera. *Valor de $p < 0,05$ calculado mediante U de Mann-Whitney en el grupo expuesto considerando genotipo.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

Al analizar la delección del gen *GSTT1* con parámetros antropométricos y bioquímicos se encontraron valores significativos con componentes del perfil lipídico en individuos no expuestos según se indica en la Tabla 10, encontrándose una relación del alelo nulo de *GSTT1* con valores significativamente menores de ICC en mujeres, y de HDL en los dos sexos.

Tabla 10: Alelo nulo de *GSTT1* y características antropométricas y bioquímicas en el grupo no expuesto.

| Parámetros | NO EXPUESTOS | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------|---|--------|-----------------|---|--------|------------------|---|--------|-----------------|---|--------|
| | MASCULINO | | | | | | FEMENINO | | | | | |
| | PRESENTE (4) | | | AUSENTE (10) | | | PRESENTE (38) | | | AUSENTE (16) | | |
| ICC | 0,97 | ± | 0,02 | 0,95 | ± | 0,04 | 0,89 | ± | 0,05 | 0,83 | ± | 0,16* |
| HDL (mg/dL) | 29,33 | ± | 5,42 | 37,96 | ± | 9,57* | 49,95 | ± | 19,03 | 59,64 | ± | 14,18* |
| LDL (mg/dL) | 180,68 | ± | 32,01 | 148,39 | ± | 37,92 | 143,54 | ± | 54,87 | 136,18 | ± | 46,59 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 153,75 | ± | 127,27 | 210,70 | ± | 141,04 | 135,89 | ± | 80,11 | 148,74 | ± | 119,15 |
| Colesterol (mg/dL) | 240,75 | ± | 51,77 | 228,50 | ± | 49,84 | 223,43 | ± | 58,33 | 223,11 | ± | 40,48 |
| Lípidos totales (mg/dL) | 635,25 | ± | 226,42 | 667,70 | ± | 212,37 | 582,74 | ± | 170,01 | 593,89 | ± | 163,29 |

Los datos corresponden a medias ± desviación estándar. ICC: índice cintura cadera, HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad. *Valor de $p < 0.05$ calculado mediante U de Mann-Whitney entre genotipos

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

3.1.6 Correlación de los polimorfismos del gen *PON-1* y parámetros antropométricos y bioquímicos de la población analizada.

Las principales diferencias encontradas con los polimorfismos del gen *PON1* se encontraron con parámetros bioquímicos relacionados a alteraciones metabólicas, especialmente lipídicas, lo cual podría relacionarse con la función que *PON1* desempeña en asociación con HDL. En el grupo de no expuestos se ve una relación con valores de HDL con el polimorfismo Leu55Met Tabla 11.

Tabla 11: Polimorfismo rs854560 (Leu55Met) de *PON1* y parámetros antropométricos y bioquímicos en el grupo no expuesto.

| Parámetros | NO EXPUESTOS | | | | | |
|-------------------------|-----------------|---|--------|--------------------------|---|---------|
| | Leu/Leu (49) | | | Leu/Met, Met/Met (19) | | |
| Peso (Kg) | 68,16 | ± | 16,16 | 61,08 | ± | 8,214 |
| Obesidad % | 26,5% | | | 21,10% | | |
| Colesterol (mg/dL) | 223,26 | ± | 53,68 | 229,84 | ± | 45,906 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 163,83 | ± | 117,19 | 119,79 | ± | 57,422 |
| HDL (mg/dL) | 46,66 | ± | 17,10 | 57,45 | ± | 18,430* |
| LDL (mg/dL) | 141,99 | ± | 49,13 | 150,53 | ± | 51,276 |
| Lípidos totales (mg/dL) | 610,36 | ± | 195,38 | 578,42 | ± | 114,947 |

Los datos corresponden a medias ± desviación estándar. HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad. *Valor de $p < 0.05$ calculado mediante U de Mann-Whitney.

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

La Tabla 12 muestra el efecto de este polimorfismo en hombres, en los cuales se ve una relación del alelo Met con valores más bajos de enzimas hepáticas.

Tabla 12: Polimorfismo rs854560 (Leu55Met) en hombres no expuestos.

| Parámetros | Leu/Leu | | Leu/Met, Met/Met | |
|--------------------|---------|---------|------------------|---------------------|
| | (12) | | (2) | |
| HDL (mg/dL) | 35,64 | ± 10,1 | 34,6 | ± 0,71 |
| TGO (UI/L) | 32,25 | ± 15,57 | 14,5 | ± 0,71 ⁺ |
| TGP (UI/L) | 23,67 | ± 14,69 | 7 | ± 0,00 ⁺ |
| GGT (UI/L) | 42,08 | ± 38,68 | 8 | ± 2,83 ⁺ |

Los datos corresponden a medias ± desviación estándar (SD). HDL: Lipoproteína de alta densidad, TGO: Transaminasa glutámico oxalacética TGP: Transaminasa glutámico pirúvica GGT: Gama glutamil transpeptidasa. Valor de p<0.05 calculado mediante U de Mann-Whitney

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

El polimorfismo Gln192Arg del gen *PON1* mostró relación con perfil lipídico en la población total analizada, datos que se muestran por genotipo en la Tabla 13.

Tabla 13: Polimorfismo rs662 (Gln192Arg) de *PON1* y parámetros antropométricos y bioquímicos en la población total analizada.

| Parámetros | GENOTIPOS | | | | | |
|------------------------------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|-----------|
| | Gln/Gln (35) | | Gln/Arg (90) | | Arg/Arg (64) | |
| Obesidad % | 3,70% | | 6,87% | | 4,76% | |
| Colesterol (mg/dL) | 244,34 | ± 62,02 | 218,97 | ± 50,02 | 207,11 | ± 47,85* |
| Triglicéridos (mg/dL) | 216,46 | ± 298,50 | 150,46 | ± 77,35 | 159,45 | ± 124,29 |
| HDL (mg/dL) | 70,53 | ± 73,39 | 58,56 | ± 15,13 | 51,59 | ± 12,40* |
| LDL (mg/dL) | 141,58 | ± 56,93 | 130,73 | ± 44,38 | 124,99 | ± 45,07 |
| Lípidos (mg/dL) | 705,14 | ± 376,71 | 588,22 | ± 160,33 | 573,61 | ± 177,68* |

Los datos corresponden a medias ± desviación estándar. HDL: Lipoproteína de alta densidad, LDL: Lipoproteína de baja densidad. * Valor de p calculado mediante H de Kruskal- Wallis *(p < 0.05).

Fuente: Autor

Elaborado por: Autor

3.2 DISCUSIÓN

La exposición humana a mezclas de plaguicidas puede originar efectos biológicos y patológicos variables, puesto que la dosis efectiva de exposición a los plaguicidas que recibe un individuo depende no solo de la exposición ambiental inicial, sino también se ve influenciada por la capacidad innata para metabolizar y excretar xenobioticos. Esta

capacidad está parcialmente determinada por los genes que codifican proteínas implicadas en estos procesos metabólicos (Márquez, 2015).

Analizando las características de la población considerando sexo y exposición a pesticidas se encontró que en los datos antropométricos tanto de hombres y mujeres expuestos presentan valores de PAS estadísticamente más altos respecto del grupo no expuesto, lo cual podría implicar un síndrome nicotínico como lo señala Gómez y Cáceres (2010), en el que destaca que la exposición a pesticidas producida en ganglios simpáticos y suprarrenales ocasiona taquicardia, hipertensión arterial, hiperexcitabilidad miocárdica y vasoconstricción periférica. En el grupo de hombres se puede ver un incremento en el IMC, ICC y porcentaje de obesidad en aquellos no expuestos a pesticidas, lo cual podría estar influido por el estilo de vida que llevan éstos, ya que este grupo reside en un lugar con mayor acceso a comida rápida y por su actividad económica tendrían un estilo de vida más sedentario.

Considerando los valores medios de los parámetros bioquímicos a pesar de presentarse algunas diferencias estadísticas, no todas son relevantes desde el punto de vista clínico ya que no sobrepasan los valores considerados normales. La situación que es importante destacar en este análisis es que en toda la población analizada se muestran valores de colesterol, LDL y triglicéridos sobre los valores de referencia para los grupos expuesto y no expuesto, y en el caso de los hombres no expuestos valores bajos de HDL; estas características poblacionales podrían relacionarse con alteraciones metabólicas o el desarrollo de problemas posteriores si no se consideran medidas para mejorar estos valores.

Las diferencias encontradas en los parámetros antropométricos indican valores de riesgo en el grupo no expuesto, lo cual correlacionado con las alteraciones bioquímicas mencionadas anteriormente estarían vinculadas a Síndrome Metabólico (Pozo, 2009), el mismo que se presenta en un 27,90 %.

Llama la atención el incremento en los valores medios de TGO, TGP, y GGT en las personas expuestas a plaguicidas, aunque no sobrepasa los valores de referencia; sin embargo, podrían estar relacionados a alteraciones de la función hepática, esto se ha reportado en estudios realizados en EE.UU, Colombia y Ecuador, en los que se ha observado un aumento de estas enzimas debido a la exposición de bifenilos policlorados y plaguicidas organoclorados. Además mencionan que, aunque los valores no sean patológicos, se estarían mostrando alteraciones subclínicas de la función hepática y renal debido a la exposición crónica que involucra bajas dosis de plaguicidas a largo plazo (Serdar et al., 2014; López y Zambrano, 2015; Viteri et al., 2015).

Los valores hematológicos analizados en la población no presentaron valores fuera de los rangos de referencia y a pesar de mostrar diferencias estadísticas en algunos parámetros no serán considerados ya que todos se ubicaron dentro de los rangos de referencia.

Del análisis genético realizado en el presente estudio se encontró que la frecuencia del alelo nulo del gen *GSTM1* fue del 44,97 %, dato que es comparable con estudios reportados en Africa: 44 %, Asia: 50 % y Europa: 40 % (Piacentini et al., 2011; Gaspar et al., 2002; Salem et al., 2011), de poblaciones de América los porcentajes cercanos con el presente estudio son las de Brasil: 39,7 %; Bolivia: 39 % y Argentina: 45 % (Kasthurinaidu et al., 2015; Tirado et al., 2012; Weich et al., 2017); por el contrario, en un estudio realizado por Gaspar et al. (2002) en una tribu Guaraní ubicada en Paraguay las cifras fueron inferiores de 3,9 %.

El alelo nulo del gen *GSTT1* muestra una alta frecuencia en poblaciones de Africa: 50 %, Asia: 48 % y Bolivia: 59 % (Kirk et al., 2005; Tamaki et al., 2011; Tirado et al., 2012b), resultados que son semejantes a los obtenidos en este estudio: 48,51 %. Según Saitou y Ishida (2015), Europa reporta las frecuencias más bajas de la delección entre 10 y 33 %.

El polimorfismo rs1695 (Ile105Val) del gen *GSTP1* presentó un 62,28 % para la variante Val, datos que concuerdan con los reportados en Brasil de 62,8 % (Chielle et al., 2016). En México en un estudio realizado en población amerindia, se observa datos similares que van de 59 a 86 % para esta variante (Juárez et al., 2010); sin embargo, en Argentina sucede lo contrario, el alelo Ile predomina con un 66,5 % (Weich et al., 2017). La diferencia en las frecuencias reportadas para diferentes poblaciones podría deberse al origen étnico de cada una de ellas.

En cuanto al análisis de los polimorfismos del gen *PON1* se encontró que de rs854560 (Leu55Met) la frecuencia de la variante en esta población es de 7,7 %, resultados que son semejantes a los encontrados en Corea: 4,3 %, China: 4,7 % y México: 6 % (Shin et al., 2008; Zhang et al., 2006; López et al., 2009). Por el contrario, en el polimorfismo rs662 (Gln192Arg) la frecuencia de la variante fue del 57,67 % para el alelo Arg, datos que son comparables con estudios realizados en China: 53,7 % y México: 60 % (Zhang et al., 2006; López et al., 2009). Al analizar a la población expuesta y no expuesta a plaguicidas de acuerdo con los genotipos en estudio se pudo evidenciar que no existen diferencias estadísticamente significativas por ello no se detallan en el mismo.

Al correlacionar los datos de valores bioquímicos y antropométricos con los diferentes polimorfismos se pudo evidenciar una asociación del alelo nulo *GSTM1* en población expuesta con la obesidad, mostrándose un mayor porcentaje de obesidad para individuos que presentan la delección del gen, dichos resultados también coinciden con lo reportado por

Saruwatari et al. (2013), donde se evidenció que la combinación del alelo nulo *GSTM1* y el tabaquismo podrían estar asociados al riesgo de anomalías metabólicas como el sobrepeso y niveles reducido de colesterol HDL.

El alelo nulo de *GSTT1* analizado en el grupo no expuesto presento valores significativos con niveles bajos de ICC en el sexo femenino y niveles altos de HDL para ambos sexos, resultados que son contradictorios con los reportados por dos estudios; en el primero señalan una asociación significativa entre el genotipo nulo del gen *GSTT1* y su haplotipo con niveles altos de ICC, mientras que en el segundo estudio señalan que la presencia de genotipos de delección doble de los genes *GSTM1* y *GSTT1* se asocian con niveles bajos de colesterol HDL e hipertrigliceridemia en humanos (Pozo, 2009; Maciela et al., 2009).

Los polimorfismos del gen *PON1* se encontraron relacionados con parámetros bioquímicos en la población analizada, pero no se presentó una relación exclusiva en individuos expuestos a pesticidas. El polimorfismo Leu55Met analizado mediante modelo dominante en el grupo no expuesto mostro correlación con niveles altos de HDL para los individuos con los genotipos Leu/Met, Met/Met, este efecto es contrario a lo reportado por Agachan et al. (2004), donde destacan niveles bajos de HDL en los genotipos Leu/Met, Met/Met y más bien los niveles se elevan al presentar el genotipo silvestre Leu/Leu. Analizándolo por sexo el efecto de este polimorfismo se encontró que los hombres con el alelo Met presentaron valores significativamente más bajos de las enzimas hepáticas TGO, TGP y GGT, situación que no se ha podido explicar debido a la falta de literatura en cuanto a esta asociación sobre el efecto hepatoprotector que podría generar la variante.

El polimorfismo Gln192Arg en población general presento valores significativamente más bajos de colesterol, HDL y lípidos totales en aquellos individuos con genotipos que incluyen el alelo Arg, situación que es similar a la reportado por Aviram et al. (2000) y Gupta et al. (2009) donde señalan que el alelo Gln es más eficiente en la protección contra la oxidación de las lipoproteínas HDL y LDL, y la variante Arg se ha observado como factor de riesgo debido a que altera la capacidad de la enzima para proteger a las LDL de la oxidación. Mientras que otros estudios indican que los niveles de HDL aumentan en el genotipo Arg/Arg, situación que no concuerda con el presente estudio (Agachan et al., 2004).

Actualmente hay muchos estudios que evalúan genes polimórficos asociados a patologías o a una mayor susceptibilidad de padecerlas, especialmente en poblaciones consideradas en riesgo; sin embargo, algunos autores indican que es difícil evaluar el efecto individual de un polimorfismo genético sobre un fenotipo determinado ya que este podría estar modulado por otros factores como son el mestizaje de la población, costumbres, exposición, hábitos alimenticios, factores ambientales y genéticos, lo cual podría explicar la heterogeneidad de

efectos de los mismos polimorfismos que existen en diferentes poblaciones (Arráiz et al., 2014; Costa et al., 2005).

CONCLUSIONES

Del análisis genético en el presente estudio se puede indicar que:

La frecuencia del alelo nulo del gen *GSTM1* es del 44,97 %, y el alelo nulo del gen *GSTT1* del 48,15 %.

Del polimorfismo Ile105Val del gen *GSTP1* se encontró que en la población el alelo más frecuente es el Val con un 62,86 %.

De los polimorfismos analizados del gen *PON1* se encontraron las siguientes frecuencias: 7,7 % para el alelo Met de Leu55Met (rs854560) y 57,67 % para el alelo Arg de Gln192Arg (rs662).

El alelo nulo de *GSTM1* se relacionó con un mayor porcentaje de obesidad en población expuesta a plaguicidas; mientras que el alelo nulo de *GSTT1* se relacionó con niveles bajos de ICC y niveles altos de HDL en población no expuesta a plaguicidas.

El alelo Met del polimorfismo Leu55Met del gen *PON1* mostro relación con niveles altos de HDL en población no expuesta; además, analizándolo por sexo se observó que en hombres se relacionó significativamente con valores más bajos de las enzimas hepáticas TGO, TGP y GGT.

El alelo Arg del polimorfismo Gln192Arg del gen *PON1* se mostró en relación con valores de colesterol, HDL y lípidos totales más bajos en población general.

RECOMENDACIONES

Dada la importancia y participación de GST y PON1 en el metabolismo y reacciones de detoxificación se recomienda realizar estudios de valoración de la actividad enzimática a fin de contrastar ésta con la presencia de los polimorfismos en los genes. Por otro lado, es necesario complementar estos análisis correlacionando los datos y resultados con variables externas como estilo de vida, tipo de exposición, entre otros los cuales pueden modular el efecto de los polimorfismos a nivel genético.

BIBLIOGRAFÍA

- Agachan, B., Yilmaz, H., & Karaali, Z. (2004). Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus, (January), 163–168.
- Ahluwalia, M., & Kaur, A. (2018). Modulatory role of GSTT1 and GSTM1 in Punjabi agricultural workers exposed to pesticides. *Environmental Science and Pollution Research*, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1459-7>
- Arráiz, N., Bermúdez, V., Rojas, J., Mujica, E., Perez, D., Ramos, M., & Prieto, C. (2014). Asociación de variante alelica Pro12Ala del gen ppar γ 2 con obesidad y componentes del síndrome metabólico en una población de Maracaibo. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*, 9(1), 18–25.
- Aviram, M., Hardak, E., Vaya, J., Mahmood, S., Milo, S., Hoffman, a, ... Rosenblat, M. (2000). Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation*, 101, 2510–2517. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.101.21.2510>
- Avivar, C., Candau, A., Delgado, M., Gómez, C., Guillén, J., Hernández, A., ... Yélamos, F. (2003). *Respuesta ante las intoxicaciones agudas por plaguicidas*. Recuperado a partir de <http://www.ugr.es/~ajerez/publicaciones/3.pdf>
- Bataller, R. (2004). *Toxicología clínica*. Valencia.
- Bonola, I., Irigoyen, M., Vera, L., Campero, S., & Hamdan, A. (2014). Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal. *Ciencias Clínicas*, 15(1), 2–8.
- Bräutigam, M., Teusch, N., Schenk, T., Sheikh, M., Aricioglu, R. Z., Borowski, S. H., ... Pietsch, M. (2015). Selective inhibitors of glutathione transferase P1 with trioxane structure as anticancer agents. *ChemMedChem*, 10(4), 629–639. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402553>
- Canales, A., & Sánchez-Muniz, F. (2013). Paraoxonase, something more than an enzyme? *Medicina Clínica*, 121(14), 537–548. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(03\)74011-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0025-7753(03)74011-1)
- Cascales, M., & Rodés, J. (1990). *Hepatología*. (S. A. RAYCAR, Ed.). Madrid. Recuperado a partir de https://books.google.com.ec/books?id=SYQ4-BBxK_4C&pg=PA116&lpg=PA116&dq=cascales+maria+hepatologia+glutacion&source=bl&ots=-RYh3Xb2bW&sig=XcZisNG4eAAh80-

YAVhFBAZuOwl&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiL8sv60cfbAhUJ2FMKHatxB1YQ6AEIOz
AD#v=onepage&q=GLUTATION TRANSFERAS

Centro de Información Toxicológica de Veracruz. (1958). *Intoxicación por plaguicidas bupiridilos*. México. Recuperado a partir de <https://www.ssaver.gob.mx/citver/files/2017/04/Intoxicacion-por-Plaguicidas-Bupiridilos.pdf>

Chielle, E., Fortuna, P., & Maziero, J. (2016). Association between the glutathione S-transferase P1 (GSTP1) Ile105Val gene polymorphism in obese and overweight patients over 60 years. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 52(4), 211–216. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20160035>

Costa, L. G., Vitalone, A., Cole, T. B., & Furlong, C. E. (2005). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*, 69(4), 541–550. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.08.027>

Draganov, D. I., Teiber, J. F., Speelman, A., Osawa, Y., Sunahara, R., & La Du, B. N. (2005). Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *Journal of Lipid Research*, 46(6), 1239–1247. <https://doi.org/10.1194/jlr.M400511-JLR200>

Eskenazi, B., Kogut, K., Huen, K., Harley, K. G., Bouchard, Maryse Bradman, A., Boyd-Barr, D., & Johnson, Caroline Hollanda, N. (2015). Organophosphate pesticide exposure, PON1, and neurodevelopment in school-age children from the CHAMACOS study. *Environ Res*, 134, 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.001>

Ferraz, S., Chacín, M., Angulo, J., Araujo, V., Bravo, M., & Arends, A. (2014). ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE GLUTATIÓ S-TRANSFERASA: Analysis of genetic polymorphisms of Glutathione S-Transferase: GSTM1 and GSTT1 in venezuelan patients with leukemia ., 17(4), 44–50.

Ferré, N., Tous, M., Paul, A., Zamora, A., Vendrell, J., Bardají, A., & Joven, J. (2002). Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. *Clinical Biochemistry*, 35(3), 197–203.

Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(SUPPL. 1), 155–171. <https://doi.org/10.4321/S1137-66272003000200009>

Fortunato, G., Rubba, P., Panico, S., Trono, D., Tinto, N., Mazzaccara, C., ... Sacchetti, L. (2003). A paraoxonase gene polymorphism, PON 1 (55), as an independent risk factor

- for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. *Atherosclerosis*, 167(1), 141–8.
- Fridman, O., Fuchs, A., Porcile, R., Morales, A., & Gariglio, L. (2011). Paraoxonasa: sus múltiples funciones y regulación farmacológica. *Elsenvier*, 81(3), 251–260.
- Gago, A. (2016). *Estudio metalo-metabolómico de bioindicadores de áreas costeras y estuarinas del suroeste de la Península Ibérica*. Universidad de Huelva. <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- García, M., Quintero, E., Benito, R., Strunka, M., Nicolás, D., Parra, A. S., ... Lanás, A. (2009). IMPORTANCIA DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS ISOFORMAS GSTM1, GSTT1 Y GSTP1 DE LA GLUTATION S-TRANSFERASA EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER GÁSTRICO. *Gastroenterología y Hepatología*, 32(3), 233–234. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.01.119>
- Gaspar, P., Hutz, M., Salzano, F., Hill, K., Hurtado, A., Petzl-Erler, M., ... Weimer, T. (2002). Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *American Journal of Physical Anthropology*, 3(119), 249–56.
- Gómez, M., & Cáceres, J. (2010). Toxicidad por insecticidas organofosforados en fumigadores de Campaña contra el Dengue, estado Aragua, Venezuela, año 2008. *Boletín de Malariología y Salud ambiental*, 50(1). Recuperado a partir de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1690-46482010000100012&script=sci_arttext&tlng=pt
- Gupta, N., Gill, K., & Singh, S. (2009). Paraoxonases: Structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res*, 130, 361–368.
- Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Meged, R., ... Tawfik, D. S. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(5), 412–419. <https://doi.org/10.1038/nsmb767>
- Hernández, F., Foces, C., & Martínez, M. (1995). *Cristalografía*. (S. A. RAYCAR, Ed.). España. Recuperado a partir de <https://books.google.com.ec/books?id=VJ1rPZpknYUC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Joven, J., & Camps, J. (2007). Paraoxonasa-1 y arteriosclerosis: Al disminuir la oxidación se reduce la respuesta inflamatoria. *Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis*, 19(6), 300–302. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(07\)74215-8](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(07)74215-8)

- Juárez, R., Canto, P., Canto, T., Rangel, H., Rosas, H., Rodríguez, M., ... Coral, R. (2010). Analysis of polymorphisms in genes (AGT, MTHFR, GP11a, and GSTP1) associated with hypertension, thrombophilia and oxidative stress in Mestizo and Amerindian populations of México. *Disease Markers*, 28(5), 323–331. <https://doi.org/10.3233/DMA-2010-0712>
- Kasthurinaidu, S. P., Ramasamy, T., Ayyavoo, J., Dave, D. K., & Adroja, D. A. (2015). GST M1-T1 null allele frequency patterns in geographically assorted human populations: A phylogenetic approach. *PLoS ONE*, 10(4), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118660>
- Kirk, G., Turner, P., Gong, Y., Lesi, O., Mendy, M., Goedert, J., ... Wild, C. (2005). Hepatocellular carcinoma and polymorphisms in carcinogen-metabolizing and DNA repair enzymes in a population with aflatoxin exposure and hepatitis B virus endemicity. *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 14, 373–9.
- Kniffin, C. (2007). GLUTATHIONE S-TRANSFERASE, PI; GSTP1. Recuperado a partir de <https://www.omim.org/entry/134660?search=GST&highlight=gst>
- Lecourtois, G. (2013). *Detección de polimorfismos del gen Glutación S-Transferasa en individuos con caries*. Universidad Autónoma del estado de México.
- Leiro, V. (2008). *Influencia de los factores genéticos en la hepatotoxicidad secundaria a fármacos antituberculosos*. Universidad de Santiago de Compostela.
- Leiro, V., Fernández, A., Valverde, D., Constenla, L., Vázquez, R., Piñeiro, L., & González, A. (2008). Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 homozygous null mutations on the risk of antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in a Caucasian population. *Liver International*, 28(6), 835–839. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01700.x>
- Li, D., Dandara, C., & Parker, M. I. (2010). The 341C / T polymorphism in the GSTP1 gene is associated with increased risk of oesophageal cancer. *BMC Genetics*. Recuperado a partir de <http://sci-hub.bz/10.1186/1471-2156-11-47>
- López, I., Lacasaña, M., Blanco, J., Aguilar, C., Sanchez, P., Pérez, O., & Gamboa, R. (2009). Relationship between human paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters*, 188(2), 84–90.
- Lopez, K., & Zambrano, M. (2015). Prácticas de Salud Ocupacional y niveles de biomarcadores séricos en aplicadores de plaguicidas de cultivos de arroz en Natagaima-Tolima, Colombia. *Revista de Toxicología*, 32(2), 102–106.

- Maciela, S., Pereira, A., Silva, G., Rodrigues, M., Mill, J., & Kriegera, J. (2009). Association between glutathione S-transferase polymorphisms and triglycerides and HDL-cholesterol. *Atherosclerosis*, 206(1), 204–208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.011>
- Márquez, D. (2015). *Caracterización de la actividad enzimática y polimorfismos genéticos de la paraoxonasa-1 (PON-1), en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados en el municipio de Soacha 2014*. Universidad Nacional de Colombia. Recuperado a partir de <http://www.bdigital.unal.edu.co/48607/>
- Martínez, G. (2014). *Efecto de la exposición ocupacional a plaguicidas sobre la calidad espermática, daño al ADN y su asociación con los polimorfismos de GST*. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Mendonça, E., Salazar, E., & Fernández, M. (2016). Papel de las variantes GSTM1, GSTT1 y MnSOD en el desarrollo de enfermedad de Alzheimer de aparición tardía y su relación con el alelo 4 de APOE. *Neurología*, 31(8), 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2014.10.012>
- Organización Mundial de la Salud. (1992). *Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura*. España.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD Y ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA ALIMENTACIÓN Y LA AGRICULTURA. (2017). *Manual sobre la elaboración y uso de las especificaciones de plaguicidas de la FAO y la OMS: Tercera revisión de la primera edición (1a ed.)*. Roma. Recuperado a partir de <http://www.fao.org/3/a-i5713s.pdf>
- Pauletti, M. (1999). *Manual de Precauciones en El Manejo de Plaguicidas*. Recuperado a partir de <https://books.google.com.ec/books?id=vuYqAAAAYAAJ&pg=PA10&dq=plaguicidas+toxicidad&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiv4MCf-sjXAhUDfiYKHczCQ4Q6AEIJDA#v=onepage&q=plaguicidas+toxicidad&f=false>
- Piacentini, S., Polimanti, R., Porreca, F., Martínez-Labarga, C., Franco De Stefano, G., & Fuciarelli, M. (2011). GSTT1 and GSTM1 gene polymorphisms in European and African populations. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 1225–1230.
- Pierre, F., & Betancourt, P. (2007). Residuos de plaguicidas organoclorados y organofosforados en el cultivo de cebolla en la depresión de quíbor, Venezuela. *Bioagro*, 19(2), 69–78.

- Pinhel, M., Sado, C., Longo, G., Gregório, M., Amorim, G., Florim, G., ... Souza, D. (2013). Nullity of GSTT1/GSTM1 related to pesticides is associated with Parkinson's disease. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 71(8), 527–32. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130076>
- Pozo, G. (2009). *Estudio de genes GST en población lojana y su asociación a rasgos metabólicos*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Ramírez, J., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y Medición De La Exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67–75. Recuperado a partir de <http://www.scsmt.cat/Upload/TextCompleto/2/1/216.pdf>
- Rodríguez, J., & Rodeiro, I. (2014). Cytochrome P450 system and xenobiotic metabolism. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(2), 495–507. <https://doi.org/749-283>
- Rungrutai, U., Saengtong, P., Jantana, W., Aaron, J., La-aied, P., Matthew, C., & Albert, J. (2005). Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme. *Biochemical Journal*, 388(3), 763–771.
- Saad-Hussein, A., Noshay, M., Taha, M., El-Shorbagy, H., Shahy, E., & Abdel-Shafy, E. A. (2017). GSTP1 and XRCC1 polymorphisms and DNA damage in agricultural workers exposed to pesticides. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 819(May), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.05.005>
- Sailaja, K., Surekha, D., Rao, D. N., Rao, D. R., & Vishnupriya, S. (2010). Association of the GSTP1 gene (Ile105Val) polymorphism with chronic myeloid leukemia. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 11(2), 461–4. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843134>
- Saitou, M., & Ishida, T. (2015). Distributions of the GSTM1 and GSTT1 null genotypes worldwide are characterized by latitudinal clines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(1), 355–361. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.1.355>
- Salem, A., Yaqoob, A., Ali, M., Handu, S., Fadel, R., Abu-Hijleh, M., & Almawi, W. (2011). Genetic polymorphism of the glutathione S-transferase M1 and T1 genes in three distinct Arab populations. *Disease Markers*, 31(5), 311–6. <https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0845>.
- Sandoval, A., Aguilar, M., Vázquez, F., Castellanos, F. X., Barraza, M., Sierra, E., ... Salas, J. M. (2014). Polymorphisms in the GSTT1 and GSTM1 genes are associated with increased risk of preeclampsia in the Mexican mestizo population. *Genetics and Molecular Research*, 13(1), 2160–2165. <https://doi.org/10.4238/2014.January.17.3>

- Saruwatari, J., Yasui-Furukori, N., Kamihashi, R., Yoshimori, Y., Oniki, K., Tsuchimine, S., ... Nakagawa, K. (2013). Possible associations between antioxidant enzyme polymorphisms and metabolic abnormalities in patients with schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 9, 1683–1698. <https://doi.org/10.2147/NDT.S52585>
- Serdar, B., LeBlanc, W. G., Norris, J. M., & Miriam Dickinson, L. (2014). Potential effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and selected organochlorine pesticides (OCPs) on immune cells and blood biochemistry measures: A cross-sectional assessment of the NHANES 2003-2004 data. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-114>
- Sharma, A., Pandey, A., Sharma, S., Chatterjee, I., Mehrotra, R., Sehgal, A., & Sharma, J. K. (2014). Genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) in Delhi population and comparison with other global populations. *Meta Gene*, 2(1), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2013.12.003>
- Shin, B. S., Oh, S. Y., Kim, Y. S., & Kim, K. W. (2008). The paraoxonase gene polymorphism in stroke patients and lipid profile. *Acta Neurologica Scandinavica*, 117(4), 237–243. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00929.x>
- Tamaki, Y., Arai, T., Sugimura, H., Sasaki, T., Honda, M., Muroi, Y., ... Hiratsuka, M. (2011). Association between cancer risk and drug-metabolizing enzyme gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) polymorphisms in cases of lung cancer in Japan. *Drug Metab Pharmacokinet*, 26, 516–22.
- Tirado, N., Ascarrunz, M., Aguilar, X., & Rada, A. (2012a). Polimorfismos genéticos de la GSTM1 y GSTT1 como modificadores de riesgo mutagénico en agricultores bolivianos expuestos a plaguicidas. *Biofarbo*, 20, 20–40. Recuperado a partir de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S1813-53632012000100004&script=sci_arttext
- Tirado, N., Ascarrunz, M., Aguilar, X., & Rada, A. (2012b). Polimorfismos genéticos de la GSTM1 y GSTT1 como modificadores de riesgo mutagénico en agricultores bolivianos expuestos a plaguicidas Genetic polymorphism of GSTM1 and GSTT1 as mutagenic risk modifiers in bolivian farmers exposed to pesticides. *Biofarbo*, 20(1), 30–40.
- Tsatsakisa, A. ., Zafiroopoulos, A., Tzatzarakis, M., TZanakakis, G., & Kafatosc, A. (2009). Relation of PON1 and CYP1A1 genetic polymorphisms to clinical findings in a cross-sectional study of a Greek rural population professionally exposed to pesticides.

Toxicology Letters, 186(1), 66–72.

Viteri Bonilla, F. J., & Escobar, S. (2015). Estudio Bioquímico Clínico de la exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos sobre el perfil Hepático en agricultores de la parroquia de San Luís cantón Riobamba provincia de Chimborazo. *Facultad de Ciencias, Bachelor*, 94. <https://doi.org/UDCTFC;56T00538>

Weich, N., Roisman, A., Cerliani, B., Aráoz, H. V., Chertkoff, L., Richard, S. M., ... Fundia, A. F. (2017). Gene polymorphism profiles of drug-metabolising enzymes GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in an Argentinian population. *Annals of Human Biology*, 44(4), 379–383. <https://doi.org/10.1080/03014460.2016.1259429>

Wilce, M., & Parker, M. (1994). Structure and function of glutathione S-transferases. Recuperado a partir de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167483894900868>

World Health Organization. (2010). *The who recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009*. World Health Organization. <https://doi.org/ISBN 978 92 4 154796 3>

Zhang, Y., Zheng, F., Du, H., Krepinsky, J. C., Segbo, J. a G., & Zhou, X. (2006). Detecting the polymorphisms of paraoxonase (PON) cluster in Chinese Han population based on a rapid method. *International Journal of Clinical Chemistry*, 365(1–2), 98–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.034>

Zúñiga, L., Aquea, G., Taborda, M., Bernal, G., & Pancetti, F. (2015). Determination of the genotype and phenotype of serum paraoxonase 1 (PON1) status in a group of agricultural and nonagricultural workers in the Coquimbo Region, Chile. *J Toxicol Environ Health A*, 78(6), 357–68. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.982843>.