



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

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

Diana Cecilia Márquez Llanos

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología
Bogotá, Colombia
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

Diana Cecilia Márquez Llanos

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Toxicología

Director:

Fabio Ancizar Aristizabal Q.F. PhD

Director Instituto De Biotecnología. Universidad Nacional De Colombia

Codirectora

Alba Isabel Rodríguez Pulido MD. Msc

Directora Departamento de Toxicología. Facultad de Medicina

Línea de Investigación: Toxicogenética

Grupo de Investigación: Farmacogenética del cáncer

Línea de Investigación: Toxicología Ambiental y Ocupacional

Grupo de Investigación: TOXICAO

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá, Colombia

2015

Dedicatoria

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi formación y brindarme fortalezas en los momentos en aquellos difíciles.

A mi madre y a mi hermana, por demostrarme día a día todo su amor.

A Alvaro, mi esposo, amigo y compañero incondicional, por todo tu amor y por apoyarme en alcanzar otra meta en mi vida.

A hija Gabriela, mi pequeña guerrera, gracias por llegar a nuestras vidas.

Agradecimientos

Expreso mis más sinceros agradecimientos a todas las instituciones, dependencias y personas que hicieron posible el desarrollo de este proyecto, en especial:

A la Dirección de Investigación de la Facultad de Medicina Sede Bogotá por los recursos del proyecto con código 16716, los cuales fueron empleados para financiar la fase experimental del proyecto

A mi director, el Dr. Fabio Ancízar Aristizábal, por toda el apoyo brindado en el desarrollo de cada etapa de este proyecto, por su orientación y paciencia y por ayudarme a resolver todas mis inquietudes

A la Universidad Nacional de Colombia, la Facultad de Medicina y al Departamento y Maestría en Toxicología, especialmente a los profesores Alba Isabel Rodríguez Pulido, Jairo Téllez y Willian Quevedo por contribuir con mi formación a nivel profesional y personal.

A Ana Lucia Castilblanco, mil gracias por tu amistad y soporte continuo en cada momento de este proyecto.

Al Yara Cruz por su apoyo en la recolección de muestras de sangre de y genotipificación.

Al instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, en especial al Laboratorio de Análisis Instrumental.

A mis compañeritos de Maestria Carolina, Ana lucia, Paloma, Camilo, por su amistad.

A mis compañeros del grupo de investigación fármacogenética de cáncer, gracias por todos sus aportes, por su amistad y su apoyo.

Y por último, pero no menos importantes a mi familia por su apoyo constante y su infinita paciencia.

Resumen

La Paraoxonasa-1 (PON-1) es una A-esterasa que se hizo popular en el campo de la toxicología por su capacidad de hidrolizar in vitro diversos organofosforados, pero esta enzima ejerce otras funciones, encenrándose relacionada en diversas condiciones como Alzheimer y Parkinson, trastornos reproductivos, y enfermedades cardiovasculares. Los oxones de los organofosforados son sustratos para la enzima paraoxonasa (PON-1) del plasma, y esto da como resultado la desintoxicación como parte del metabolismo hepático de fase 1. El gen de la paraoxonasa sérica humana presenta polimorfismos de nucleótido simple como los localizados en las posiciones 55 y 192 que tienen el potencial de ser determinantes en la respuesta a la toxicidad variable de organofosforados en las personas. **Metodología:** Se estudiaron transversalmente 43 individuos expuestos ocupacionalmente a organofosforados y 40 sujetos control no expuestos. Se tomaron muestras de sangre para realizar el análisis de la actividad enzimática por espectrofotometría UV-VIS y la determinación de los polimorfismos genéticos en las posiciones 55 y 192 de la paraoxonasa-1 (PON-1) mediante PCR en tiempo real (RT-PCR). Con los datos obtenidos se realizó análisis estadístico descriptivo. **Resultados:** El valor medio de la actividad paraoxonasa (U/L) en la población estudiada fue de $143,46 \pm 95,10$, siendo un poco más alta en el grupo de referencia que en el grupo de trabajadores ($149,52 \pm 93,00$ y $138,04 \pm 94,0$ respectivamente). No se encontró relación entre la edad, el índice de masa corporal y el consumo de cigarrillo con la actividad paraoxonasa en ninguno de los 2 grupos estudiados, sin embargo en los individuos expuestos se encontró una correlación entre el consumo de alcohol y los niveles más bajos de actividad y en los controles se relacionó el consumo de medicamentos con valores altos de actividad paraoxonasa. En la población estudiada se encontraron los genotipos QQ y QR (frecuencia genotípica 0,121 y 0,879 respectivamente) para PON-1 192 LL y LM (frecuencia genotípica 0,253 y 0,747 respectivamente) para PON-1 55. La actividad paraoxonasa fue significativamente mayor en los individuos con el genotipo PON 55 LL y PON 192 QR, tanto en expuestos como en controles, y menor para los genotipos LM y QQ. **Conclusión:** Como en otras investigaciones, se encontró una relación entre los valores de la actividad paraoxonasa con los genotipos hallados en este estudio, el cual debería seguirse investigando para evaluar si se podría considerar bioindicador de susceptibilidad.

Palabras clave: Paraoxonasa, PON-1, plaguicidas, organofosforados, bioindicador de susceptibilidad, polimorfismos.

Abstract

Paraoxonase-1 (PON1) is an A-esterase which became popular in the field of toxicology for its ability to hydrolyze in vitro several organophosphates, but this enzyme performs other functions, being related under various conditions such as Alzheimer's and Parkinson, reproductive disorders, and cardiovascular diseases. Oxons forms organophosphate are substrates for the plasma paraoxonase (PON1), and this yields in detoxification of the hepatic phase 1 metabolism. The gene for human serum paraoxonase presents single nucleotide polymorphisms as SNPs located in the positions 55 and 192 that have the potential to be critical in the response to the variable organophosphate toxicity in humans. **Methods:** It was studied transversely 43 individuals which were occupationally exposed to organophosphate and 40 control subjects not exposed. Blood samples were taken for analysis of enzyme activity by UV-VIS spectrophotometry and determination of genetic polymorphisms at positions 55 and 192 of paraoxonase-1 (PON-1) by real-time PCR. With the data obtained descriptive statistical analysis was performed. **Results:** The mean value of paraoxonase activity (U/L) in the study population was 143.46 ± 95.10 , being slightly higher in the control group than in the group of workers ($149.52 \pm 93,00$ and 138.04 ± 94.0 respectively). No relationship between age, BMI and cigarette consumption and paraoxonase activity was found in any of the 2 groups, however in individuals exposed a correlation was found between alcohol consumption and lower levels activity and controls the use of medications with high levels of paraoxonase activity was related. In the population studied genotypes QQ and QR (genotype frequency 0.121 and 0.879 respectively) for PON-1192 LL and LM (genotype frequency 0.253 and 0.747 respectively) were found to PON1 55. The paraoxonase activity was significantly higher in individuals with genotype LL and PON PON 55 192 QR in both exposed and controls, and lower for LM and QQ genotypes. **Conclusion:** As in other studies, a relationship between values of paraoxonase activity with genotypes found in this study was found, which should be further investigated to assess whether it could be considered a biomarker of susceptibility.

Keywords: Paraoxonase, PON1, pesticides, organophosphates, biomarker of susceptibility polymorphisms.

Contenido

| | <u>Pág.</u> |
|--|-------------|
| Resumen | VI |
| Abstract | VII |
| Lista de figuras | X |
| Lista de tablas | XII |
| Lista de símbolos y abreviaturas | XIV |
| Introducción | 1 |
| 1. Planteamiento y Justificación | 1 |
| 1.1 Planteamiento del problema..... | 1 |
| 1.1.1 Pregunta de investigación..... | 3 |
| 1.2 Justificación..... | 3 |
| 2. Marco Teórico | 5 |
| 2.1 Plaguicidas..... | 5 |
| 2.1.1 Clasificación de plaguicidas | 5 |
| 2.1.2 Efectos del uso de plaguicidas..... | 7 |
| 2.2 Organofosforados..... | 9 |
| 2.2.1 Origen..... | 9 |
| 2.2.2 Aplicaciones | 9 |
| 2.2.3 Estructura química..... | 9 |
| 2.2.4 Aspectos toxicológicos..... | 10 |
| 2.2.4.1 Toxicocinética..... | 10 |
| 2.2.4.2 Toxicodinamia | 12 |
| 2.2.5 Manifestaciones clínicas | 13 |
| 2.2.6 Vigilancia de la exposición ocupacional | 15 |
| 2.3 Paraoxonasa | 17 |
| 2.3.1 Características estructurales de la paraoxonasa..... | 17 |
| 2.3.2 Actividad PON-1 | 19 |
| 2.3.3 Moduladores de la actividad de PON1 | 19 |
| 2.3.4 Polimorfismo de Paraoxonasa (PON-1) | 20 |
| 2.3.5 PON-1 y susceptibilidad a los Organofosforados | 23 |
| 3. Objetivos | 25 |
| 3.1 General | 25 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2 | Específicos..... | 25 |
| 4. | Metodología..... | 27 |
| 4.1 | Tipo de estudio..... | 27 |
| 4.2 | Descripción Población de Estudio..... | 27 |
| 4.2.1 | Individuos ocupacionalmente expuestos a organofosforados..... | 27 |
| 4.2.2 | Individuos Control..... | 27 |
| 4.2.3 | Criterios de inclusión..... | 28 |
| 4.2.4 | Criterios de exclusión..... | 28 |
| 4.3 | Reclutamiento de los voluntarios..... | 28 |
| 4.4 | Obtención de las muestras..... | 29 |
| 4.5 | Fase pre-analítica..... | 30 |
| 4.5.1 | Separación del suero..... | 30 |
| 4.5.2 | Extracción de ADN..... | 30 |
| 4.6 | Determinación de la actividad Paraoxonasa..... | 31 |
| 4.7 | Determinación de los polimorfismos de la PON-1..... | 32 |
| 4.7.1 | PCR Tiempo Real..... | 32 |
| 4.7.2 | Diseño de Iniciadores y sondas..... | 33 |
| 4.7.3 | Estandarización de Iniciadores - PCR convencional..... | 34 |
| 4.7.4 | Estandarización de la PCR en tiempo real..... | 35 |
| 4.7.5 | Estimación de Frecuencias Alélicas y Genotípicas para el Gen PON-1..... | 36 |
| 4.7.6 | Secuenciación..... | 36 |
| 4.8 | Análisis estadístico..... | 36 |
| 4.9 | Consideraciones Éticas..... | 37 |
| 5. | Resultados..... | 39 |
| 5.1 | Características sociodemográficas de la población de estudio..... | 39 |
| 5.2 | Características Ocupacionales..... | 44 |
| 5.3 | Actividad Paraoxonasa..... | 46 |
| 5.4 | Estimación de frecuencias genotípicas y alélicas para el Gen PON-1 en las posiciones 55 y 192..... | 53 |
| 5.5 | Secuenciación..... | 55 |
| 5.6 | Asociación entre los polimorfismos de la paraoxonasa (PON-1) y la actividad enzimática..... | 55 |
| 6. | Discusión..... | 57 |
| 6.1 | Perfil de la muestra..... | 57 |
| 6.2 | Actividad paraoxonasa..... | 57 |
| 6.3 | Polimorfismos de la paraoxonasa-1 PON-1..... | 59 |
| 6.4 | Influencia de los polimorfismos sobre la actividad paraoxonasa..... | 62 |
| 7. | Conclusiones y Recomendaciones..... | 63 |
| 7.1 | Conclusiones..... | 63 |
| 7.2 | Recomendaciones..... | 64 |
| 8. | Bibliografía..... | 65 |
| 9. | Anexos..... | 73 |
| | Anexo 1: Consentimiento informado..... | 73 |
| | Anexo 2: Encuesta características sociodemográficas, antecedentes clínicos, ocupacionales y estilo de vida..... | 74 |
| | Anexo 3: Concepto aprobatorio Comité de ética de la Facultad De Medicina..... | 77 |

Lista de figuras

| | <u>Pág.</u> |
|--|-------------|
| Figura 2-1. Efectos positivos y negativos del uso de plaguicidas..... | 7 |
| Figura 2-2. Ciclo de plaguicidas en la naturaleza | 8 |
| Figura 2-3. Estructura química de los ácidos fosfórico, fosfórico y fosfínico | 9 |
| Figura 2-4. Estructura General De Los Organofosforados..... | 10 |
| Figura 2-5. Modelo General Del Metabolismo De Plaguicidas Organofosfotonatos | 11 |
| Figura 2-6. Función fisiológica de la acetilcolina y su fosforilacion por los OPs | 13 |
| Figura 2-7. De Paraoxon a Paranitrofenol y Dietilfosfato por la enzima Paraoxonasa 1.17 | 17 |
| Figura 2-8. Estructura general de la paraoxonasa 1 | 18 |
| Figura 2-9. Hidrólisis de clorpirifos-Oxon, paraoxón y diazoxón por la PON1 | 19 |
| Figura 2-10. Efectos biológicos y modulación de la PON – 1..... | 20 |
| Figura 2-11. Representación esquemática de los polimorfismos más prevalentes para PON1, PON2 y PON3 | 21 |
| Figura 2-12. Metabolismo PON1-dependiente de clorpirifos-oxon y diazoxon | 23 |
| Figura 4-1. Esquema de obtención y tratamiento de la muestra | 29 |
| Figura 4-2: Química de las sondas taqman. | 32 |
| Figura 4-3. Estandarización de la PCR..... | 35 |
| Figura 5-1. Distribución de la población de estudio según lugar de nacimiento | 39 |
| Figura 5-2. Distribución porcentual de la población de estudio según genero. | 41 |
| Figura 5-3. Distribución porcentual de la población de estudio según grupos..... | 41 |
| etéreos. | 41 |
| Figura 5-4. Distribución porcentual de la población de estudio según el IMC. | 42 |
| Figura 5-5. Distribución porcentual de la población de estudio de acuerdo a sus enfermedades previas. | 43 |
| Figura 5-6. Distribución porcentual de los trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados según el tiempo de ejercer el trabajo. | 44 |
| Figura 5-7. Distribución porcentual de los trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados de acuerdo al proceso en el que participan..... | 45 |
| Figura 5-8. Histograma de frecuencia de la actividad paraoxonasa (U/L). | 46 |
| Figura 5-9. Diagrama de cajas y bigotes para actividad paraoxonasa (U/L) | 47 |
| Figura 5-10. Actividad paraoxonasa según grupos etarios | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 5-11. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al IMC (Kg/m ²)..... | 50 |
| Figura 5-12. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de cigarrillo..... | 50 |
| Figura 5-13. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de alcohol..... | 51 |
| Figura 5-14. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de medicamentos | 52 |
| Figura 5-15. Actividad paraoxonasa (U/L) en relación a los años de exposición a OPs.. | 52 |
| Figura 5-16. Respuesta de Amplificación de las muestras..... | 53 |
| Figura 5-17. Distribución de los polimorfismos de la PON1 en las posiciones 55 (LL, LM y MM) y 192 (QQ, QR y RR) en muestras de voluntarios expuestos y controles de la población Colombiana. | 54 |
| Figura 5-18. Actividad paraoxonasa en expuestos y controles de acuerdo con los polimorfismos genéticos 55 y 192..... | 56 |

Lista de tablas

| | <u>Pág.</u> |
|---|-------------|
| Tabla 2-1. Clasificación de los plaguicidas según su función..... | 6 |
| Tabla 2-2. Clasificación de la OMS para plaguicidas según categoría toxicológica | 6 |
| Tabla 2-3. Polimorfismos en la región reguladora..... | 21 |
| Tabla 2-4. Polimorfismos en la región codificadora | 22 |
| Tabla 4-1. Resultado de búsqueda en GenBank | 33 |
| Tabla 4-2. Iniciadores empleados en la genotipificación del PON-1 55 y 192..... | 34 |
| Tabla 4-3. Mezcla de reacción empleada en la amplificación | 34 |
| Tabla 4-4. Condiciones de PCR empleadas en la amplificación | 34 |
| Tabla 4-5. Condiciones evaluadas para iniciadores y sondas de PCR en tiempo real | 35 |
| Tabla 4-6. Condiciones de la PCR en tiempo real | 36 |
| Tabla 5-1. Distribución de la población de estudio según características generales y sociodemográficas | 40 |
| Tabla 5-2. Datos descriptivos de Edad | 41 |
| Tabla 5-3. Datos descriptivos del IMC | 42 |
| Tabla 5-4. Datos clínicos de la población | 43 |
| Tabla 5-5. Listado de plaguicidas organofosforados elaborados en la empresa | 45 |
| Tabla 5-6. Datos descriptivos de la actividad paraoxonasa en la población estudiada ... | 47 |
| Tabla 5-7. Análisis de correlación entre variables cuantitativas en los individuos expuestos a organofosforados | 48 |
| Tabla 5-8. Análisis de correlación entre variables cuantitativas en grupo control..... | 48 |
| Tabla 5-9. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo a grupos etarios..... | 48 |
| Tabla 5-10. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al IMC (Kg/m ²) | 49 |
| Tabla 5-11. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de cigarrillo | 50 |
| Tabla 5-12. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de alcohol | 51 |
| Tabla 5-13. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de medicamentos | 51 |
| Tabla 5-14. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo a los años de exposición | 52 |
| Tabla 5-15. Frecuencias Genotípicas y Alélicas estimadas para los polimorfismos 55 y 192 del Gen PON-1 | 54 |
| Tabla 5-16. Actividad paraoxonasa por cada genotipo de PON-1 | 55 |
| Tabla 5-17. Actividad paraoxonasa y polimorfismos en individuos con intoxicaciones previas | 56 |
| Tabla 6-1. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas para PON-1 55 de diferentes grupos étnicos | 60 |

| | |
|--|----|
| Tabla 6-2. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas para PON-1 192 diferentes grupos étnicos..... | 61 |
|--|----|

Lista de símbolos y abreviaturas

| | |
|---------------------|---|
| AChe | Acetilcolinesterasa |
| ADN | Ácido Desoxiribonucleico |
| DZOasa | Diazoxonasa |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas Para la Alimentación y la Agricultura |
| IMC | Índice de masa Corporal |
| L | Leucina |
| M | Metionina |
| Nm | Nanómetros |
| NTE | Estearasa Neurotóxica |
| ONU | Organización de Naciones Unidas |
| OP | Organofosforado |
| PON-1 | Proteína Paraoxonasa-1 |
| PON-2 | Proteína Paraoxonasa-2 |
| PON-3 | Proteína Paraoxonasa-3 |
| PON-1 192Q/R | Polimorfismo genético en el codón 192 con sus formas alternativas Q y R |
| PON-1 55L/M | Polimorfismo genético en el codón 55 con sus formas alternativas L y M |
| PONasa | Paraoxon-Hidrolasa |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| Q | Glutamina |
| R | Arginina |
| rPON1 | PON recombinante |
| SNP | Polimorfismo de Nucleótido Simple |
| URT | Región no traducida del gen “untranslated región” |
| 3'-URT | Región no traducida “corriente abajo”, que contacta mediante el carbono 3' del último desoxirribonucleótido del marco de lectura. |
| UV | Ultravioleta |
| WT | Wild-Type |

Introducción

Los plaguicidas organofosforados (OPs) son una de las principales clases de insecticidas que se encuentran en uso desde mediados de la década de 1940, se usan alrededor del mundo, para incrementar la producción agrícola y para mejorar la salud pública. Las características principales de los organofosforados son su alta toxicidad, su baja estabilidad química y su nula acumulación en los tejidos. Sin embargo la toxicidad que ejercen no se limita a los insectos puesto que pueden ejercer efectos adversos importantes en especies no objetivo, incluyendo los seres humanos. Debido a la fosforilación de la acetilcolinesterasa, ejercen principalmente una toxicidad colinérgica (Lucio G Costa, 2006; Gutierrez et al., 2012)

En el campo de la toxicología se ha puesto mucha atención en el desarrollo de biomarcadores para ser utilizados como indicadores de exposición, de efectos sobre la salud y de susceptibilidad. Las mediciones de los metabolitos de la orina y de actividad de la colinesterasa en sangre se establecen los biomarcadores de exposición y de los primeros efectos biológicos a la intoxicación por organofosforados respectivamente. En los últimos años, han sido de interés creciente a los biomarcadores de susceptibilidad a la toxicidad porque se ha encontrado que existen diferencias de base genética en la respuesta a sustancias químicas ambientales (Lucio G Costa, Cole, Vitalone, & Furlong, 2005; A F Hernández et al., 1999).

En este sentido, tanto la paraoxonasa (PON) y la colinesterasa (ChE) se han propuesto como marcadores de susceptibilidad a (OPs), como se ha demostrado las actividades enzimáticas de estas pueden variar dentro de la población sana y estar bajo control genético. Mientras que las esterasas "A" como la PON-1 hidrolizan a los insecticidas OPs a sus metabolitos correspondientes; las esterasas "B" como las colinesterasas, por el contrario, son el blanco sobre las que estos insecticidas ejercen su acción tóxica. Las diferencias interindividuales en la actividad de estas enzimas pueden contribuir a las variaciones en la susceptibilidad del hombre a los efectos tóxicos de los organofosforados (A F Hernández et al., 1999).

El sistema de la paraoxonasa protege frente a la intoxicación por insecticidas organofosforados cuyos metabolitos activos sean sustratos de esta enzima, descomponiéndolos antes de que la inhibición de la colinesterasa. Probablemente esta enzima aporta escasa protección frente a una intoxicación aguda, puesto que el sistema paraoxonasa no alcanzaría a metabolizar las altas concentraciones por saturación del

sistema. Sin embargo, en exposiciones repetidas a bajas dosis la paraoxonasa presentaría una ventaja frente a la colinesterasa en los tejidos diana (L. Costa et al., 2003; A F Hernández et al., 1998).

Las paraoxonasas son una familia de enzimas compuestas por 3 miembros: PON-1, PON-2 y PON-3, que se encuentran en el cromosoma 7. El miembro más estudiado ha sido la paraoxonasa-1 (PON-1), estearasa/lactonasa asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y codificada por el gen PON1. Las primeras investigaciones se centraron en su capacidad para hidrolizar los metabolitos activos (oxones) de un número de insecticidas organofosforados tales como el paratión, diazinon y clorpirifos, y su nombre deriva de uno de los sustratos más comúnmente utilizados in vitro, el paraoxón (Draganov & La Du, 2004).

La clonación del gen PON1 en 1993 permitió la identificación de más de 200 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en diferentes regiones del gen PON1. La presencia de polimorfismos genéticos en la PON1 afecta la expresión y la actividad de la enzima. La mayoría de los estudios se han centrado en 2 polimorfismos de la región codificante (Q192R y L55M) y varios polimorfismos la región promotora 3'-UTR. El polimorfismo Q192R que consiste en una mutación en la región codificante de PON1, resultando en la sustitución de una glutamina (alelo Q) por una arginina (alelo R), mientras que el polimorfismo L55M es resultado de la sustitución de una leucina (alelo L) por una metionina (alelo M) en la posición 5 (Lucio G Costa, Giordano, Cole, Marsillach, & Furlong, 2013)

Diversos investigadores han indicado que la actividad de la paraoxonasa-1 en poblaciones humanas, muestra una distribución polimórfica con una gran variabilidad interindividual en los niveles de actividad de la PON1 y diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos 55 y 192. Para el polimorfismo PON-1 192 Q/R el alelo Q es menos eficiente que el R para hidrolizar paraoxón, pero más eficiente frente a diazoxón, somán y sarín, impartiendo una actividad catalítica diferencial hacia algunos sustratos de organofosforados, mientras que para el polimorfismo PON-1 55L/M el alelo M está asociado con concentraciones más bajas. Ambos contribuyen a la determinación del "status" de la paraoxonasa-1 de un individuo (Fridman, Fuchs, Porcile, Morales, & Gariglio, 2011).

El advenimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de ADN con las mejoras, modificaciones y la automatización ha proporcionado una forma muy conveniente para hacer cada genotipo de los polimorfismos de PON1, contribuyendo al campo emergente de la toxicología, la "toxicogenómica" (L G Costa et al., 1999)

1. Planteamiento y Justificación

1.1 Planteamiento del problema

Los plaguicidas son ampliamente utilizados en la agricultura para mejorar la producción, proteger los cultivos almacenados y como control de enfermedades transmitidas por vectores, su uso es una de las prácticas que más ha contribuido al incremento de la producción mundial de alimentos en las últimas décadas (Gutiérrez & Londoño, 2009; Simoniello et al., 2010).

Sin embargo aunque los plaguicidas se usen de forma correcta, sus efectos tóxicos también se pueden manifestar en los organismos no objetivos de su uso, incluidos los humanos, forjando riesgos que se manifiestan en nuevas patologías, resultantes de la exposición a estos tóxicos (Gutiérrez & Londoño, 2009). Según datos de la OMS, anualmente se intoxican entre 2-3 millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas. De ese total, las 3/4 partes de personas afectadas pertenecen a los países subdesarrollados, donde únicamente se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas (Lucio G Costa, 2006; Jeyaratnam, 1990; Ministerio de protección social, 2007).

La intoxicación por plaguicidas es un problema significativo en los países en vía desarrollo debido principalmente a las prácticas de manejo inadecuadas. La inseguridad se ve agravada por el analfabetismo y la pobreza en la mayoría de las comunidades agrícolas. Los plaguicidas clasificados como extremadamente o altamente peligrosos por la FAO y la OMS, incluidos los prohibidos por otros países, se siguen utilizando en estas regiones. La exposición ocupacional a plaguicidas se presenta por múltiples factores, por ejemplo muchos agricultores almacenan en o cerca de sus residencias los plaguicidas, o los utilizan de forma inadecuada o insegura y los trabajadores de fábricas no siguen las adecuadas prácticas de higiene ocupacional, estas situaciones llevan aparejado inexorablemente un mayor riesgo de exposición y, por tanto, una mayor incidencia de intoxicaciones agudas y crónicas (Kesavachandran et al., 2009).

Entre los plaguicidas, los organofosforados son unos de los más ampliamente utilizados en la agricultura y el medio ambiente de interiores. Las personas se pueden ver expuestas a estas sustancias a nivel ambiental, alimentario y ocupacional esta última se

puede producir en la agricultura y la salud pública o nivel industrial durante los procedimientos de fabricación, transporte y formulación (Simoniello et al., 2010).

La intoxicación aguda con organofosforados produce hiperexcitabilidad del sistema nervioso que puede llevar a la muerte, sin embargo estos compuestos también dan lugar a efectos crónicos nocivos sobre la salud humana, como trastornos neuropsicológicos, disrupción del sistema endocrino, anomalías del desarrollo, trastornos del sistema inmunológico e hipersensibilidad, también se ha establecido una posible asociación entre la exposición a organofosforados y los cánceres de pulmón, próstata, así como el linfoma no Hodgkin y la leucemia (Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011).

En Colombia existe una alta dependencia hacia los plaguicidas por ser un país principalmente agrícola, ocupando el tercer lugar en latinoamérica, en el consumo después de Brasil y México (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, 2008). La industria de plaguicidas se inicia en este país hacia el año de 1962, con base en la importación de ingredientes activos. En 1964, se amplía la tecnología de la industria hacia la síntesis de algunos ingredientes activos. Durante la década del 70, en Colombia se intensificó el uso de plaguicidas, principalmente en cultivos de algodón, maíz, arroz y papa, que consumieron más del 90% del total de los insecticidas producidos (Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, Augusto, & Gómez, 2007).

En los años 2007 y 2008, se reportaron al Sistema de Vigilancia Epidemiológica (SIVIGILA) 4.793 y 6.565 intoxicaciones agudas por plaguicidas respectivamente. Sin embargo estas estadísticas sobre intoxicaciones agudas y crónicas son no recogen la totalidad de los casos, debido a la ausencia de un adecuado sistema de indicadores a nivel nacional y a la escasa capacitación de los trabajadores de la salud frente al tema, lo que dificulta aún más la elaboración del diagnóstico y el registro de los casos, además no se hace un seguimiento a largo plazo por los altos costos, la cantidad y complejidad de las variables relacionadas y la dificultad de establecer asociaciones causales (Ministerio de protección social, 2007).

La exposición humana a mezclas de plaguicidas puede originar efectos biológicos y patológicos desiguales, 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, que conlleva a la variabilidad en la susceptibilidad a los efectos de la exposición crónica. En la detoxificación de los organofosforados participan dos familias de enzimas metabolizadoras estas son las citocromo P450 y las paraoxonasas (PON), específicamente la PON-1 (Simoniello et al., 2010).

La PON-1 muestra polimorfismos genéticos, de ahí que la actividad frente a los sustratos sea diferente en función de la isoforma que actúe. En la región reguladora se encuentran polimorfismos en la posición 192 glutamina/arginina (Q/R) y en la posición 55 leucina/metionina (M/L). La arginina (R) se relaciona con una mayor actividad paraoxonasa y la isoforma leucina (L) se asocia a una mayor concentración de PON1 en suero. Esto indica que existen diferencias en la susceptibilidad a organofosforados de unos individuos con respecto a otros y de unas poblaciones a otras. La variación polimórfica en la actividad paraoxonasa sérica afecta el metabolismo de los organofosforados en individuos en riesgo de exposición y, por tanto, incrementa el riesgo de intoxicación crónica por organofosforados (Lucio G Costa, Vitalone, Cole, & Furlong, 2005; A. Hernández, López, Gil, & Rodrigo, 2007; Povey, 2010).

Se ha descrito una correlación entre la variación en la actividad de PON-1, debida a los polimorfismos en el gen, con la susceptibilidad a la toxicidad por organofosforados. Por ello, conocer la actividad enzimática y los genotipos en diversas poblaciones toma especial relevancia para identificar susceptibles a los efectos tóxicos de los insecticidas organofosforados.

1.1.1 Pregunta de investigación

¿Cuál será el comportamiento de la actividad enzimática y los polimorfismos genéticos de la paraoxonasa-1 (PON-1), en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados de una empresa productora de agroquímicos del municipio Soacha -Cundinamarca?

1.2 Justificación

El aumento en las necesidades de producción de alimentos y de más productos de la agricultura ha llevado a la producción masiva de productos químicos para el control de las plagas, generando la presencia de problemas de tipo ambiental y en la salud de las personas expuestas a estos productos. En el balance riesgo-beneficio de los plaguicidas hay que considerar no sólo los efectos agudos sobre la salud sino también la aparición de efectos crónicos que se reportan con mayor frecuencia en los trabajadores con exposición ocupacional y que también se pueden evidenciar por exposición alimentaria y ambiental en la población general.

Para la intoxicación con organofosforados se ha descrito correlación entre la variación en la actividad de la PON-1, debida a los polimorfismos en el gen, con la susceptibilidad a la toxicidad, por esto es importante y necesario conocer la actividad enzimática y realizar un análisis completo de los genes potencialmente implicados en su metabolismo, identificando los distintos polimorfismos de nucleótido único (SNP) que contribuyen a la variabilidad individual en su metabolismo.

Los genotipos de PON-1 en diversas poblaciones toman especial relevancia en identificar individuos susceptibles a los efectos tóxicos de los organofosforados. No obstante, la variación interindividual existente en la población no expuesta de las actividades enzimáticas hace necesaria la realización de estudios poblacionales para detectar aquéllos individuos más susceptibles a la intoxicación por organofosforados.

Hasta el momento no se cuenta con hasta el momento con estudios y publicaciones que hagan una caracterización de los polimorfismos del gen de la PON-1 en el país. Este biomarcador de susceptibilidad podría ser de gran utilidad en la evaluación de riesgos tóxicos, e incluso podría considerarse su incorporación a los controles sanitarios de trabajadores dentro de los programas de vigilancia de la salud.

2.Marco Teórico

2.1 Plaguicidas

El aumento de los rendimientos y la calidad de los productos agrícolas, se debe en gran medida al uso de plaguicidas, los cuales se utilizan para (Fenik, Tankiewicz, & Biziuk, 2011):

- Controlar el número de plagas que destruyen las plantas enteras o sus partes;
- Aumentar la producción de biomasa de animales y plantas;
- Combatir las algas, bacterias, hongos y malas hierbas;
- Combatir las plagas de los animales que dañan los cultivos (por ejemplo, los ácaros, áfidos, insectos, larvas y nematodos);
- Estimular o inhibir los procesos de crecimiento de las plantas (por ejemplo, eliminar el exceso de flores, follaje o destruir a secar las plantas);
- Hacen posible la acción de otras sustancias;
- Matar organismos nocivos en granjas, casas, hospitales, tiendas y vehículos.

2.1.1 Clasificación de plaguicidas

La diversidad de sus estructuras químicas, mecanismos de acción y aplicaciones hace que cualquier clasificación de los plaguicidas sea compleja. Fenik J, et al, 2011 proponen una serie de criterios a tener en cuenta para clasificar los plaguicidas:

- Toxicidad
- Efectos de la aplicación
- Estructura química
- Estabilidad en el medio ambiente
- Vías por las que penetran en los organismos objetivo

Según su función como se ve en la tabla 2-1, los plaguicidas se clasifican en pueden ser insecticidas, fungicidas, herbicidas y rodenticidas (Fernández, Mancipe, & Fernández, 2010).

Tabla 2-1. Clasificación de los plaguicidas según su función

| Tipo de Plaguicida | Organismo Objetivo | Ejemplos |
|---------------------|--------------------|---|
| Insecticidas | Insectos | Organoclorados: endrín, aldrín, DDT, lindano, toxafeno Organofosforados: paratión, clorpirifos, diazinon, diclorvos, malation, dimetoato Carbamatos: aldicarb, carbofuran, propoxur, carbaril. Piretrinas y piretroides: resmetrina, bioresmetrina, aletrina, decametrina, permetrina. Otros: ivermectina |
| Fungicidas | Hongos | Sales de cobre: oxiclورو de cobre y sulfato de cobre. Derivados de la ftalimida: captafol Dinitrofenoles: dinitro-orto-cresol Dithiocarbamatos: maneb, zineb, mancozeb. |
| Herbicidas | Hierbas y malezas | Bipiridilos: paraquat, diquat. Glifosato |
| Rodenticidas | Roedores | Inorgánicos: sulfato de talio, anhídrido arsenioso, fosfuro de aluminio, fosfuro de zinc. Orgánicos: anticoagulantes: cumarinas (Warfarina). |

La dosis letal 50 (DL₅₀) se define como la cantidad de una sustancia que al ser suministrada a animales de experimentación mata al 50% de esa población y con los datos obtenidos se establece la categoría toxicológica de cada sustancia como se muestra en la tabla 2-2, (Fernández et al., 2010):

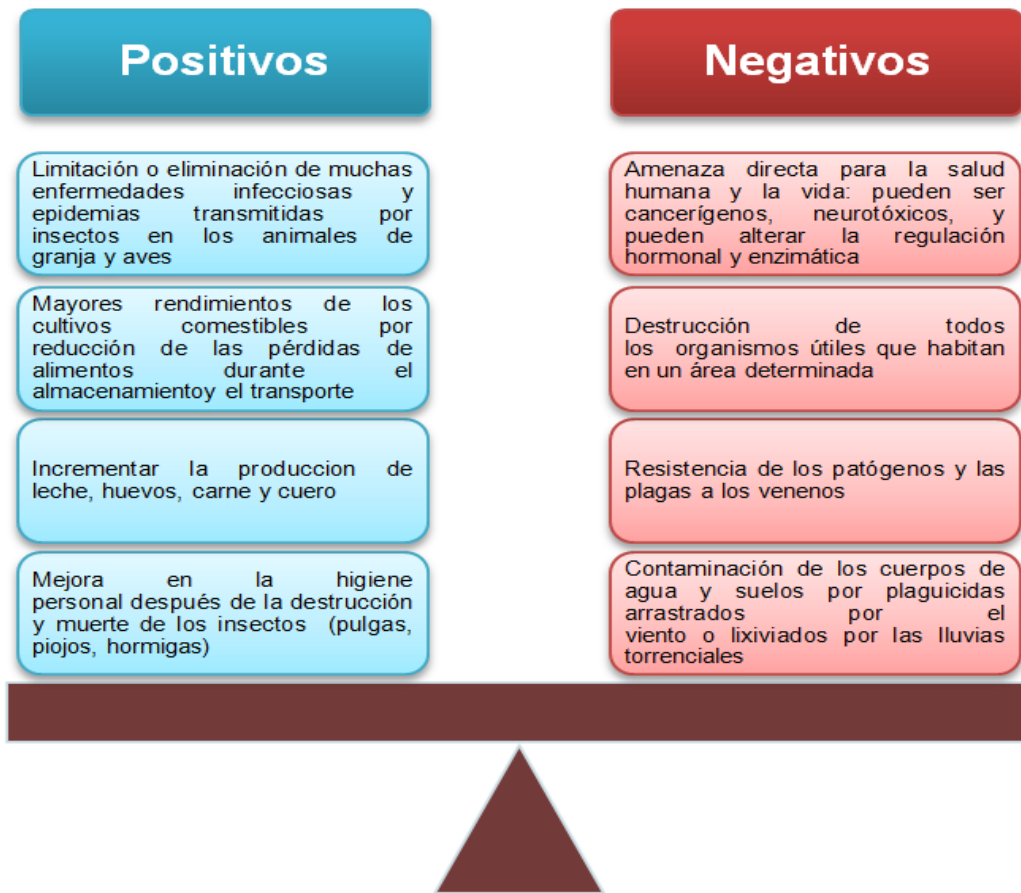
Tabla 2-2. Clasificación de la OMS para plaguicidas según categoría toxicológica

| Clase | Denominación | DL50 en ratas (mg sustancia/kg de peso) | | | |
|------------|--------------------------|---|----------|------------|----------|
| | | Oral | | Dérmica | |
| | | Sólidos | Líquidos | Sólidos | Líquidos |
| Ia | Extremadamente peligroso | <5 | <20 | <10 | <40 |
| Ib | Altamente peligroso | 5 a 50 | 20 a 200 | 10 a 100 | 40-400 |
| II | Moderadamente peligroso | 50 a 500 | 200-2000 | 100 a 1000 | 400-4000 |
| III | Ligeramente peligroso | >500 | >2000 | >1000 | >4000 |

2.1.2 Efectos del uso de plaguicidas

A pesar de sus muchos méritos, los plaguicidas son algunas de las sustancias más tóxicas, ambientalmente estables y móviles en el medio ambiente. Las cantidades de plaguicidas en una región en particular dependen en gran medida de la intensidad de la aplicación y de los tipos de cultivos. Los plaguicidas tienen muchas ventajas, pero también hacen mucho daño al medio ambiente y al hombre, por lo cual es importante tener en cuenta los efectos positivos y negativos de los plaguicidas empleados (figura 2-1), para lograr la selectividad total de sus acciones (Fenik et al., 2011).

Figura 2-1. Efectos positivos y negativos del uso de plaguicidas



Adaptado de Fenik et al., 2011

Aunque el uso de plaguicidas tiene beneficios, se han sugerido riesgos para la salud en los seres humanos que están ocupacionalmente o ambientalmente expuestos a estos agroquímicos (Simoniello et al., 2010). Con su capacidad de estabilidad del medio

ambiente, bioacumulación y toxicidad pueden provocar en el hombre un mayor riesgo de enfermedades e intoxicación. El hombre puede ingerir plaguicidas por diversas vías (figura 2-2), a través del medio ambiente y de la cadena alimenticia, como ocurrió con los tratamientos con insecticidas organoclorados en plantas forrajeras, que al ser consumidas se acumulan en las grasas de los animales, pasando al ser humano cuando éste se alimenta de la carne (Fenik et al., 2011)

Figura 2-2. Ciclo de plaguicidas en la naturaleza



Adaptado de Fenik et al., 2011

La exposición ocupacional ocurre en el marco de las actividades económicas de producción, preparación de mezclas, transporte y/o lavado de equipos y rociado de cosechas. La exposición crónica a los plaguicidas se asocia con múltiples daños a la salud incluyendo neurotoxicidad carcinogénesis, alteraciones reproductivas y del desarrollo y efectos inmunológicos. En estos casos, los individuos a menudo están expuestos a los plaguicidas diferentes o mezclas de plaguicidas, ya sea simultáneamente o en serie, lo que hace difícil identificar los efectos de cada uno por separado. Así, los biomarcadores de exposición y el efecto se pueden utilizar para detectar los cambios inducidos por los plaguicidas en los tejidos humanos, que ocurre antes de la determinación de los efectos adversos para la salud (Simoniello et al., 2010).

2.2 Organofosforados

2.2.1 Origen

A pesar de que una serie de compuestos orgánicos de fósforo (OP) fueron sintetizados en el 1800, su desarrollo como insecticidas sólo se produjo a finales de 1930 y principios de 1940. El químico alemán Gerhard Schrader se acreditó el descubrimiento de la estructura química general para la síntesis del primer insecticida organofosforado comercializado (TEPP pirofosfato de tetraetilo), y el de uno de los más conocidos, el paratión, en 1944. Desde entonces, cientos de compuestos organofosforados han sido fabricados y comercializados en todo el mundo en una variedad de formulaciones (Buratti, Leoni, & Testai, 2007; Lucio G Costa, 2006).

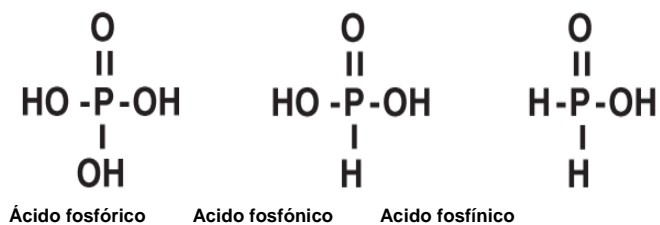
2.2.2 Aplicaciones

Los plaguicidas organofosforados tienen múltiples aplicaciones en ambientes agrícolas, industriales (solventes, plastificantes, retardantes de la llama) y en el hogar y como consecuencia de ello, se utilizan ampliamente en todo el mundo. Su valor en la optimización de la productividad agrícola, el control de las enfermedades transmitidas por vectores es evidente, sin embargo, los plaguicidas (y sus residuos) se encuentran ahora entre los productos químicos sintéticos más distribuidos en nuestro entorno, en consecuencia, existen peligros inherentes a la salud pública, ya que no existe pesticida inocuo y todos tienen importantes riesgos toxicológicos (Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011; Terry, 2012).

2.2.3 Estructura química

El término genérico organofosforados u "OP", es utilizado para una amplia variedad de químicos. Por lo general son compuestos que tienen una estructura de éster (doble enlace P=O) y se derivan de los ácidos fosfórico, fosfórico y fosfínico, como se observa en la figura 2-3 (Terry, 2012). A los organofosforados se les conoce como organofosfonatos cuando el oxígeno ha sido reemplazado por un átomo de azufre (Buratti et al., 2007).

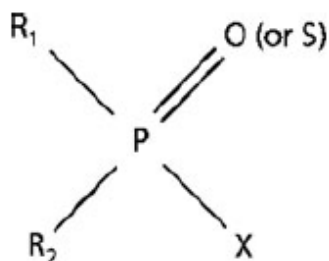
Figura 2-3. Estructura química de los ácidos fosfórico, fosfórico y fosfínico



Dentro de los insecticidas organofosforados, se incluyen a todos los compuestos orgánicos que contienen fósforo caracterizan por la presencia del enlace doble P=O y se utilizan para combatir las plagas en las plantaciones industriales, huertos y cultivos de hortalizas. Por lo general se descomponen con bastante facilidad en la superficie y el interior de las plantas y en el suelo (Buratti et al., 2007).

Como se observa en la figura 2-4, la estructura general de los organofosforados presenta dos radicales R1 y R2 que pueden ser alquilo, alcoxi, ariloxi, amido u otros y X puede ser un grupo haluro, fenoxi, tiofenoxi, fosfato, carboxilato, etc (Lucio G Costa, 2006).

Figura 2-4. Estructura General De Los Organofosforados



Fuente: Costa L (2006)

2.2.4 Aspectos toxicológicos

2.2.4.1 Toxicocinética

- **Absorción**

La vía de exposición de los organofosforados tiene un efecto primario sobre la absorción, así como diferentes sitios tienen un diferente tipo y capacidad para la absorción. En general los organofosforados pueden penetrar al organismo por inhalación, ingestión y a través de la piel intacta debido a su alta liposolubilidad, característica que hace que pasen las barreras biológicas más fácil, y por su volatilidad facilitando su inhalación (Fernández et al., 2010).

La vía cutánea es la menos eficiente y la penetración varía según la zona anatómica (en cara, frente, cuero cabelludo y cuello se absorbe de dos a seis veces más que el antebrazo, el estado de la piel), el grado de hidratación, las enfermedades y daños en la piel (Karalliedde, Edwards, & Marrs, 2003). La liposolubilidad intrínseca de los organofosforados se ve influenciada también por la presencia de otros componentes es la presentación comercial (como disolventes orgánicos, detergentes y agentes emulsionantes), que actúan potenciando de la penetración dérmica (Karalliedde et al., 2003).

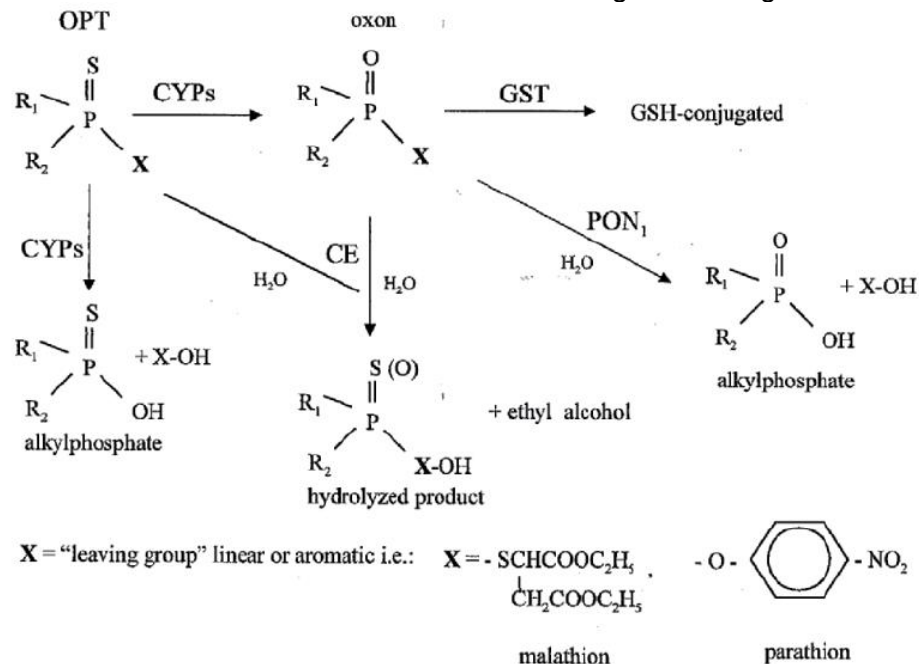
• **Distribución**

La distribución de la dosis absorbida dependerá del punto de absorción. 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. Por esta razón, se pueden presentar crisis colinérgicas con compuestos como el fentión y clorfentión, los cuales son los más lipofílicos causando redistribución organofosforado presente en el tejido adiposo hacia la sangre (Hernández Plazas & Olarte, 2011; Karalliedde et al., 2003).

• **Metabolismo**

Los organofosforados son metabolizados por una serie de enzimas (esterasas, enzimas microsomales, transferasas) siguiendo las dos fases habituales de detoxificación de los xenobióticos del organismo en general, las denominadas fase I y fase II, este proceso se da fundamentalmente en el hígado, donde el compuesto sufre una serie de transformaciones químicas. Estas transformaciones tienden a aumentar la hidrosolubilidad del plaguicida y por consiguiente facilitan su excreción, la cual se da a nivel renal (Fernández et al., 2010). Sin embargo modificaciones metabólicas mediada por CYP pueden resultar en la bioactivación del organofosforado, particularmente en el caso de los que son absorbidos como organofosforatos "la forma Tion", que conduce a la formación de un análogo " oxón" reemplazando un átomo de azufre (desulfuración) por un oxígeno en el insecticida padre (figura 2-5) (Buratti et al., 2007; L. Costa et al., 2003; Lucio G Costa, 2006; Karalliedde et al., 2003).

Figura 2-5. Modelo General Del Metabolismo De Plaguicidas Organofosforatos



Fuente: Buratti et al., 2007.

Los sistemas enzimáticos principales que están involucrados en las reacciones oxidativas, reductivas o hidrolítica que desintoxican organofosforados son las oxigenasas microsomales (citocromo P-450, la flavina monooxigenasas), A-esterasas, carboxilesterasas (incluyendo B-esterasas) y fluorohidrolasas. Las reacciones desintoxicantes de fase II, como la conjugación, implican principalmente a la glutatión S-transferasa y amidasas. Estos procesos son dependientes de la afinidad de los productos químicos a las enzimas implicadas y las concentraciones molares de las enzimas activas y de los organofosforados. La afinidad varía con el producto químico y la enzima implicada (Karalliedde et al., 2003; Lee, Poet, Smith, Busby-Hjerpe, & Timchalk, 2010).

Las enzimas que se encuentran en la piel juegan un papel después de la exposición dérmica. Estos incluyen la paraoxonasa y carboxilesterasa. La absorción de los compuestos como el paraoxón y afines es lenta, este metabolismo puede ser un mecanismo importante para limitar la toxicidad dérmica. De manera similar, la actividad de las enzimas en el tracto respiratorio juega un papel importante después de inhalación (Karalliedde et al., 2003).

- **Eliminación**

La vía renal es la principal vía de excreción de organofosforados sin cambios o como metabolitos (Karalliedde et al., 2003). Entre el 75 y el 100 % de los organofosforados administrados por vía oral se transforma en compuestos solubles, prolongándose su eliminación urinaria por un periodo que oscila entre las 24 y 48 horas tras la administración (experimental).

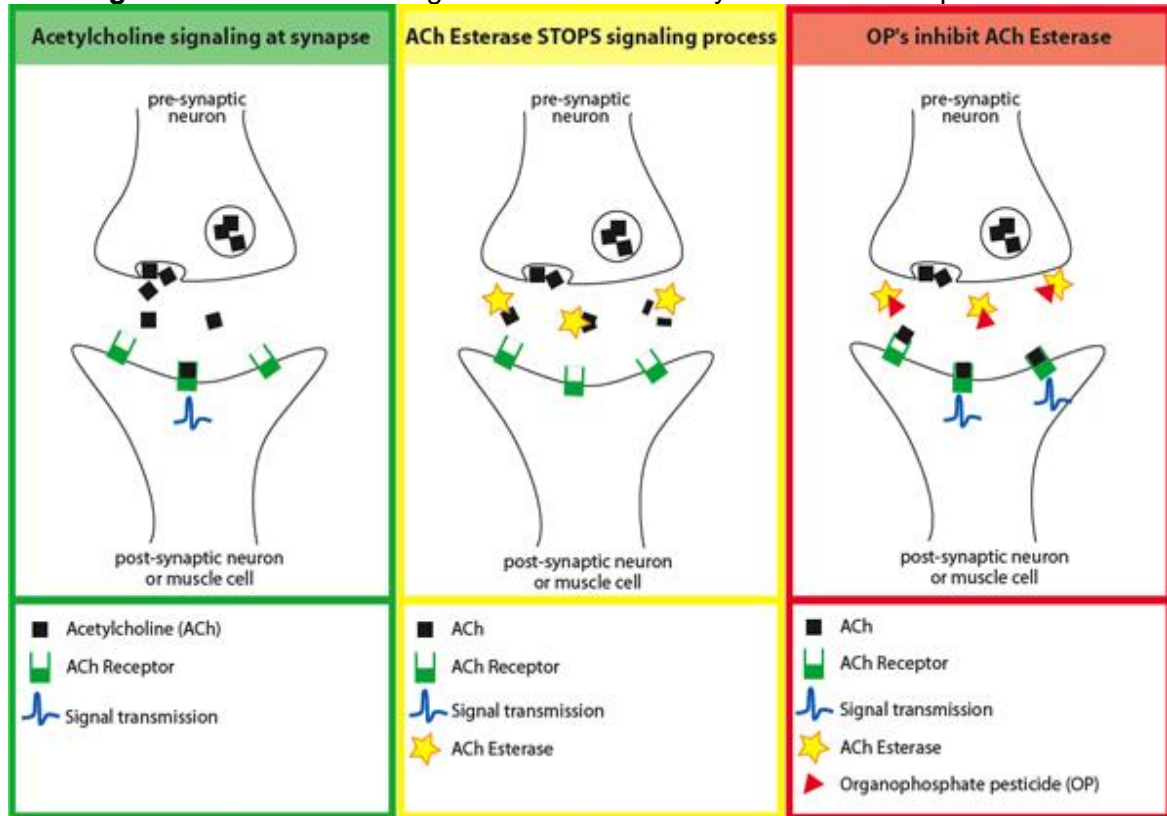
2.2.4.2 Toxicodinamia

Su toxicidad depende de la inhibición de la actividad de las enzimas que controlan las funciones del sistema nervioso, sobre todo la acetilcolinesterasa. Todos los organofosforados actúan por la fosforilación de la acetilcolinesterasa y la obtención de un espectro de efectos colinérgicos, lo que les confiere una alta toxicidad por ser inhibidores permanentes de la colinesterasa (Lucio G Costa, 2006; Fenik et al., 2011).

La acetilcolinesterasa es una B-esterasa, que cuyo papel fisiológico según se observa en la figura 2-6 es la hidrólisis de la acetilcolina, un neurotransmisor importante en el sistema nervioso periférico (autónomicos y somático motor) y central. Los organofosforados con un resto P=O fosforilan un grupo hidroxilo en la serina de la enzima, impidiendo así su acción sobre el substrato fisiológico. El enlace entre el átomo de fósforo y el sitio esteárico de la enzima es mucho más estable que el enlace entre el carbono carbonilo de acetato (en acetilcolina) (Buratti et al., 2007; Lucio G Costa, 2006). El bloqueo de la actividad de la colinesterasa provoca la acumulación de acetilcolina en la sinapsis colinérgicas, con la sobre-estimulación de los receptores muscarínicos y

nicotínicos lo que lleva a un estado de hiperexcitación y parálisis de los músculos y el centro respiratorio (Buratti et al., 2007; L. Costa et al., 2003; Lucio G Costa, 2006; Fenik et al., 2011).

Figura 2-6. Función fisiológica de la acetilcolina y su fosforilación por los OPs



Tomado de: <http://depts.washington.edu/opchild/acute.html>

Existe otra esterasa blanco de los organofosforados, llamada esterasa neuropática (NTE), la cual es inhibida en función de su estructura química por varios organofosforados. La fosforilación de NTE es similar a la observada para la acetilcolinesterasa (Lucio G Costa, 2006).

2.2.5 Manifestaciones clínicas

Intoxicación aguda: Las intoxicaciones con compuestos organofosforados pueden generar tres cuadros clínicos: el síndrome colinérgico agudo, el síndrome intermedio y una neurotoxicidad tardía (Fernández et al., 2010).

- **Síndrome colinérgico agudo:** Se presenta como consecuencia de la inhibición irreversible de la actividad de la acetilcolinesterasa en la sangre y el sistema nervioso, dando lugar a la acumulación excesiva de la acetilcolina y la activación de los receptores muscarínicos y nicotínicos, se caracteriza principalmente por cambios en el estado de conciencia, debilidad muscular y

excesiva actividad secretora. La aparición de este cuadro varía entre pocos minutos hasta doce horas posterior al contacto con el tóxico, dependiendo de la edad del paciente, la cantidad ingerida y la toxicidad intrínseca del organofosforado (Fernández et al., 2010; Hurtado Clavijo & Gutierrez de Salazar, 2005; Lukaszewicz-Hussain, 2010; Povey, 2010).

El síndrome colinérgico agudo incluye aumento de la sudoración y salivación, secreción bronquial, broncoconstricción, miosis, aumento de la motilidad gastrointestinal, diarrea, temblores, espasmos musculares y diversos efectos del sistema nervioso central (Lucio G Costa, 2006).

- **Síndrome Intermedio:** El término “síndrome intermediario” se aplica al cuadro caracterizado por recaída clínica, con gran debilidad muscular que aparece 24 a 96 horas después de la exposición pero antes que la neuropatía retardada. Puede estar asociado a una terapia insuficiente con oximas. Este síndrome aparece generalmente, luego de 4-5 días de iniciado el episodio agudo tóxico; se caracteriza por parálisis respiratoria aguda, debilidad de músculos flexores de la nuca, lengua y faringe, músculos proximales de las extremidades y músculos del tórax, con compromiso de la función respiratoria, ausencia o disminución de los reflejos osteotendinosos, debilidad en el territorio de nervios craneales motores principalmente el sexto (oftalmoparesia externa), asociado a síntomas nicotínicos el tratamiento con atropina y oximas no influencia el curso clínico del síndrome intermedio. Su incidencia es de 57,1%. Algunos estudios han mostrado que el síndrome intermedio sólo ocurre en pacientes con inhibición prolongada de la acetilcolinesterasa y que la presencia del síndrome no depende del tipo de agente tóxico involucrado (Fernández et al., 2010; Hurtado Clavijo & Gutierrez de Salazar, 2005).

- **Neuropatía retardada:** Los organofosforados fosforilan otras enzimas: fosfatasa ácida, aliesterasas, lipasas, tripsina, quimotripsina, succino-oxidasa, oxidasa-ácido ascórbico, deshidrogenasas, enzimas sulfhidrilo. Algunos pacientes, presentan una neurotoxicidad tardía, que se presenta entre la primera y tercera semana de evolución de la intoxicación aguda por organofosforados, producida a través del incremento del Ca^{2+} intracelular por alteración de la enzima calcio-calmomodulinaquinasa II y por la inhibición de la actividad de una proteína de la célula nerviosa a la que se ha dado el nombre de esterasa neurotóxica o esterasa diana de neurotoxicidad (NET), lo cual lleva a degeneración axonal en grandes neuronas distales (Fernández et al., 2010; Hurtado Clavijo & Gutierrez de Salazar, 2005).

Se trata de una polineuropatía predominantemente motora, de tipo flácido, pero también con manifestaciones de tipo sensorial, que afecta a los

músculos dístales de las extremidades que se manifiesta con debilidad ascendente pero de predominio distal, ataxia, hipotrofia muscular, hiporreflexia en miembros inferiores, calambres, parestesias, dolor neuropático, e hipoestesia; su recuperación puede ser total o parcial entre 6-12 meses con una adecuada rehabilitación. Dentro de los organofosforados que más se han asociado se encuentran el leptofox, mipafox, clorpirifox, triclorfón, fentión y diazinón (Fernández et al., 2010).

- **Intoxicación Crónica**

Los organofosforados modifican los procesos rédox del organismo, cambiando las actividades de enzimas antioxidantes y provocando aumento de la peroxidación lipídica en muchos órganos, la cual se relaciona con la cardiotoxicidad (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Sin embargo los sistemas y órganos que más pueden verse afectados por los organofosforados son el sistema nervioso central y periférico, hígado, riñones, músculos, sistema inmunológico, sistema hematológico y otros. Además se demostró la asociación entre la exposición crónica a los plaguicidas y los casos registrados de cáncer humano, debido a que estos compuestos son reconocidos genotóxicos que tiene la capacidad de inducir daño en el ADN, no sólo directamente sino también a través de otros mecanismos, tales como el estrés oxidativo o procesos inflamatorios (Shadnia et al., 2005).

- **Trastornos neuropsiquiátricos crónicos inducidos por organofosforados COPIND:** Conjunto anomalías neuroconductuales producidas por la exposición crónica a organofosforados que pueden ocurrir sin antecedentes de eventos colinérgicos y no parecen ser dependientes de la inhibición de la acetilcolinesterasa. Dentro de estas se incluyen: ansiedad, depresión, síntomas psicóticos, déficits en la memoria a corto plazo, aprendizaje, atención, procesamiento de la información, trastornos musculoesqueléticos (mialgia) la coordinación ojo-mano y el tiempo de reacción, y síntomas extrapiramidales. (Povey, 2010; Terry, 2012).

2.2.6 Vigilancia de la exposición ocupacional

El empleo de plaguicidas a nivel laboral ocasiona inevitablemente la exposición a pequeñas cantidades de los mismos que pueden variar desde niveles indetectables hasta otros fácilmente medibles utilizando determinaciones analíticas sensibles de fácil disponibilidad. La relevancia biológica de este tipo de exposiciones depende de la duración de la exposición, dosis y reactividad biológica (A F Hernández et al., 1998).

- **Biomarcadores y organofosforados**

Uno de los aspectos más importantes relacionados con la exposición laboral crónica a compuestos organofosforados es la evaluación de la toxicidad por medio de marcadores bioquímicos que constituyen una señal de alarma previa a la aparición de manifestaciones clínicas. La evaluación del riesgo de los plaguicidas precisa de indicadores biológicos (López, 2005).

- **Biomarcadores de exposición:** La exposición o absorción individual se estima mediante monitorización en fluidos y tejidos corporales de plaguicidas o sus metabolitos (determinación de alquilfosfatos en orina). Los plaguicidas y sus metabolitos pueden analizarse en muestras biológicas, suero, grasa, orina, sangre o leche materna por medio de técnicas analíticas convencionales.
- **Biomarcadores de efecto:** Determinación de las actividad colinesterasa (butirilcolinesterasa plasmática y acetilcolinesterasa eritrocitaria) y/o de otras enzimas.
- **Biomarcadores de susceptibilidad:** polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan plaguicidas. Estos últimos son de especial interés, ya que pueden predisponer a un mayor riesgo en el caso de la exposición a estos compuestos. La variación interindividual existente en la población no expuesta de alguna de estas actividades hace necesaria la realización de estudios poblacionales para detectar aquellos individuos más susceptibles a la intoxicación por organofosfatos. Se ha propuesto la determinación previa de 5 enzimas (acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, esterasa neurotóxica en linfocitos, paraoxonasa 1 y arilesterasa plasmáticas) como indicadores predictivos de susceptibilidad.

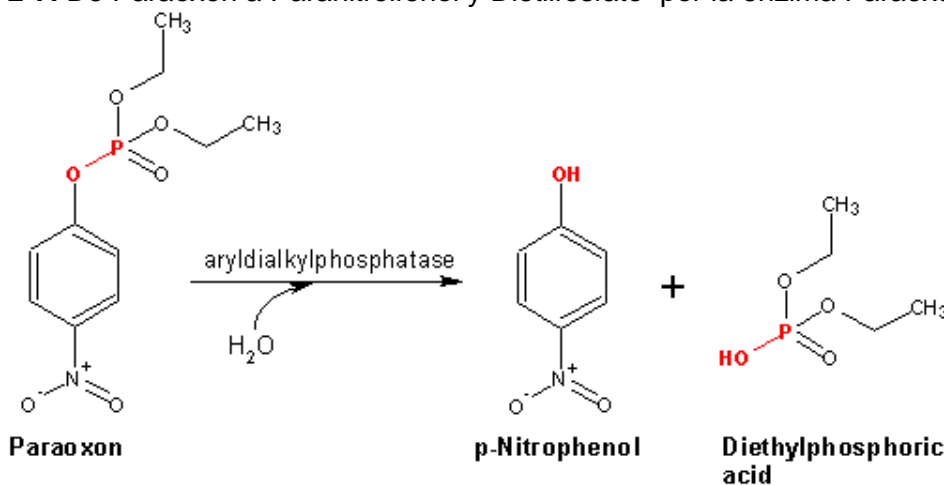
La utilidad de los biomarcadores de susceptibilidad radica en su capacidad potencial para detectar los efectos de los plaguicidas antes de que produzcan efectos adversos sobre la salud (López, 2005).

2.3 Paraoxonaxa

Las paraoxonaxas (PON) forman 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. De hecho su nombre deriva de uno de los sustratos artificiales más utilizados, el paraoxón (figura 2-7), metabolito activo del insecticida paratión (A. Hernández et al., 2007; Nus, Sánchez-Muniz, & Sánchez-montero, 2008; Valiyaveettil, Alamneh, Biggemann, et al., 2011; Valiyaveettil, Alamneh, Rezk, et al., 2011).

Mazur en 1946 fue el primero en describir la hidrólisis enzimática de compuestos organofosforados por los tejidos animales y, durante la década de 1950, Aldridge la clasificó como una esterasa «A» por su capacidad para detoxificar organofosforados para diferenciarla de las esterasas «B», representadas por las carboxilesterasas y colinesterasas, que son inhibidas por organofosforados. En la década de los noventa se descubrió su implicación en el metabolismo lipídico, pues era capaz de destruir lípidos oxidados, por lo que puede desempeñar un papel importante en las primeras fases de la patogenia de la aterosclerosis (Draganov & La Du, 2004; Mackness, Durrington, & Mackness, 1998).

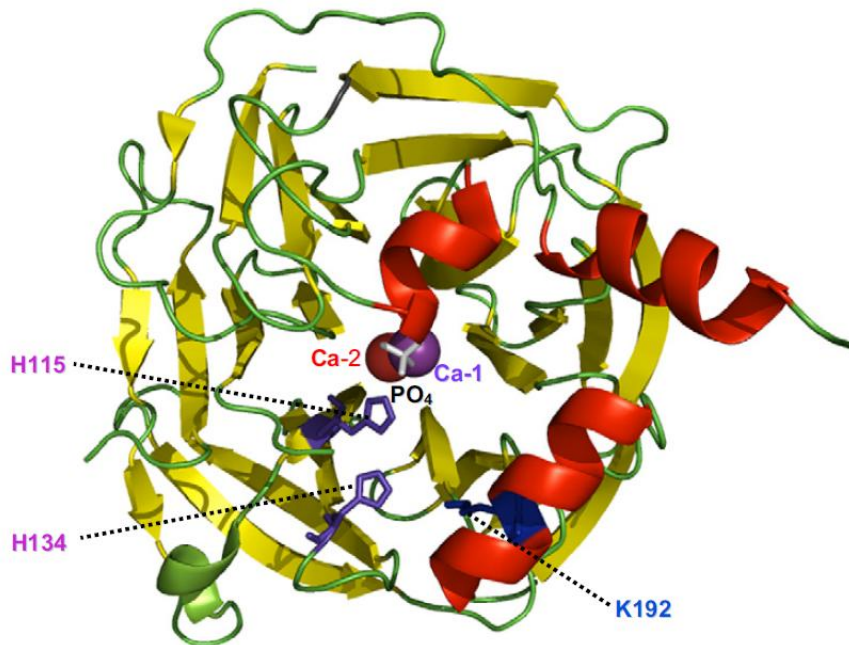
Figura 2-7. De Paraoxon a Paranitrofenol y Dietilfosfato por la enzima Paraoxonasa 1.



Tomado de: <http://eawag-bbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=r&reacID=r0067>.

2.3.1 Características estructurales de la paraoxonasa

La PON 1 es una glicoproteína dependiente de calcio compuesta por 354 aminoácidos con 44 kDa que se sintetiza y almacena, en el hígado y una porción se secreta en el plasma, donde se asocia con lipoproteínas de alta densidad HDL. Se puede encontrar también en, cerebro, pulmón, corazón, riñones, intestino delgado y aorta (Lucio G Costa, Vitalone, et al., 2005; Fridman et al., 2011; Matthews, Sutter, & Rentz, 2011).

Figura 2-8. Estructura general de la paraoxonasa 1

Fuente. Masson, Rochu, & Chabrie, 2010

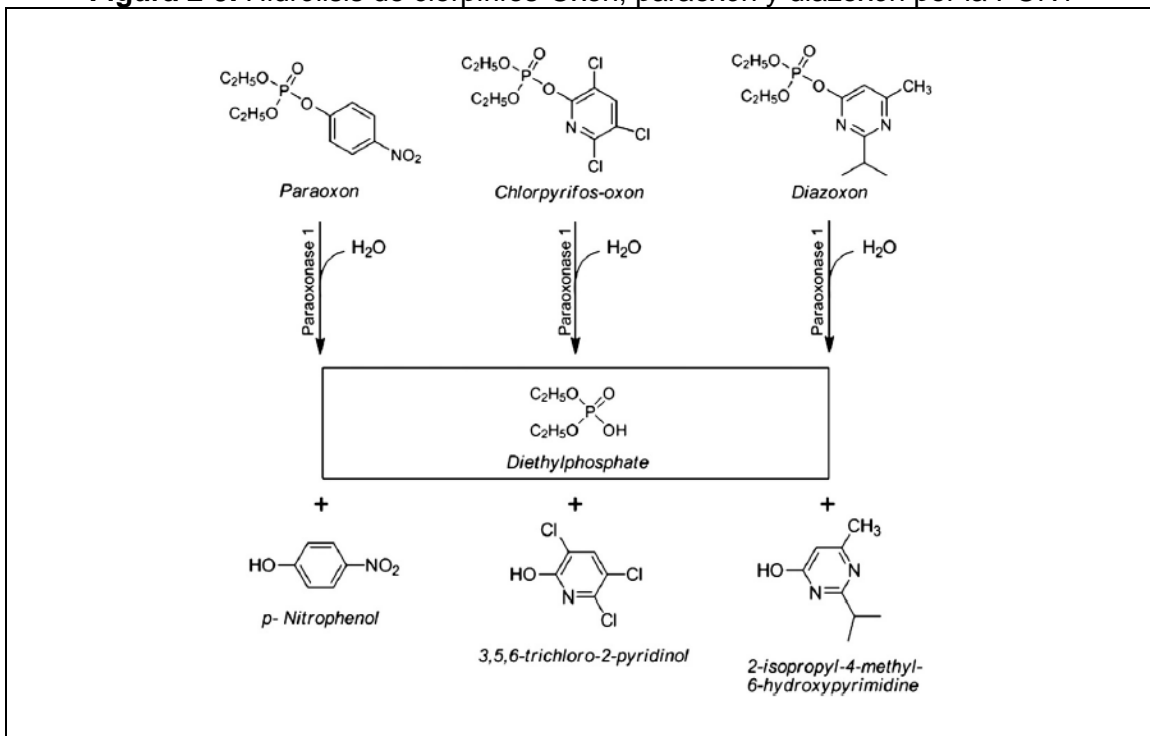
La estructura cristalina de PON1 humano no ha sido disipada. Sin embargo, el conocimiento de la estructura 3D es esencial para comprender el mecanismo catalítico de la PON1 humana y para diseñar de mutantes con actuaciones optimizadas. Sin embargo, se ha determinado la estructura de un recombinante rPON1 híbrido de mamíferos (una construcción sintética emitida desde la mezcla de conejo, ratón, rata y genes PON1 humano, expresado en *E. coli*). En la figura 2-8 se observa que la PON1 parece tener una estructura helicoidal de seis hojas- β , cada hoja formada por cuatro hebras. La hoja beta está estabilizada por un cierre tipo de «cremallera» constituido por puentes de hidrógeno entre el grupo amida y el grupo carboxilo de un filamento adyacente y los radicales se disponen alternativamente a uno y otro lado de la cadena polipeptídica y se complementa además por un puente disulfuro entre la cisteína 42 (cys) (hebra 6D) y la cys353 (hebra 6C). Contiene dos moléculas de calcio en el túnel central de la hélice, una en la parte superior (Ca1) y otra en el centro (Ca2) con una separación entre ambos de 7,4 Å. Se cree que la molécula Ca2 tiene una función meramente estructural pero cuya disociación da lugar a una desnaturalización irreversible. Sin embargo al Ca1 se le ha denominado el «calcio catalítico» se ha sugerido que el centro activo de la PON1 está formado por un calcio en la parte superior, un $(\text{PO}_4)^{3-}$ y una pareja de histidinas (hys) unidas por enlace de hidrógeno en posición 115 y 134 (Fridman et al., 2011; Masson, Rochu, & Chabrie, 2010; Nus et al., 2008).

2.3.2 Actividad PON-1

La PON-1 presenta varias actividades principalmente:

- **Paraoxonasa.** Hidroliza compuestos organofosforados: paraoxón, soman, sarin, etc. (figura 2-9).
- **Arilesterasa:** Hidroliza ésteres aromáticos como el acetato de fenilo.
- **Lactonasa:** Hidroliza lactonas aromáticas y alifáticas (dihidrocumarina, lactona del ácido homogentísico) además de catalizar la reacción reversa de lactonización de ácidos hidroxicarboxílicos (Androutsopoulos, Kanavouras, & Tsatsakis, 2011; Canales & Sánchez-Muniz, 2003; H. Cataño et al., 2005; Moreno-Banda et al., 2009; Nus et al., 2008).

Figura 2-9. Hidrólisis de clorpirifos-Oxon, paraoxón y diazoxón por la PON1



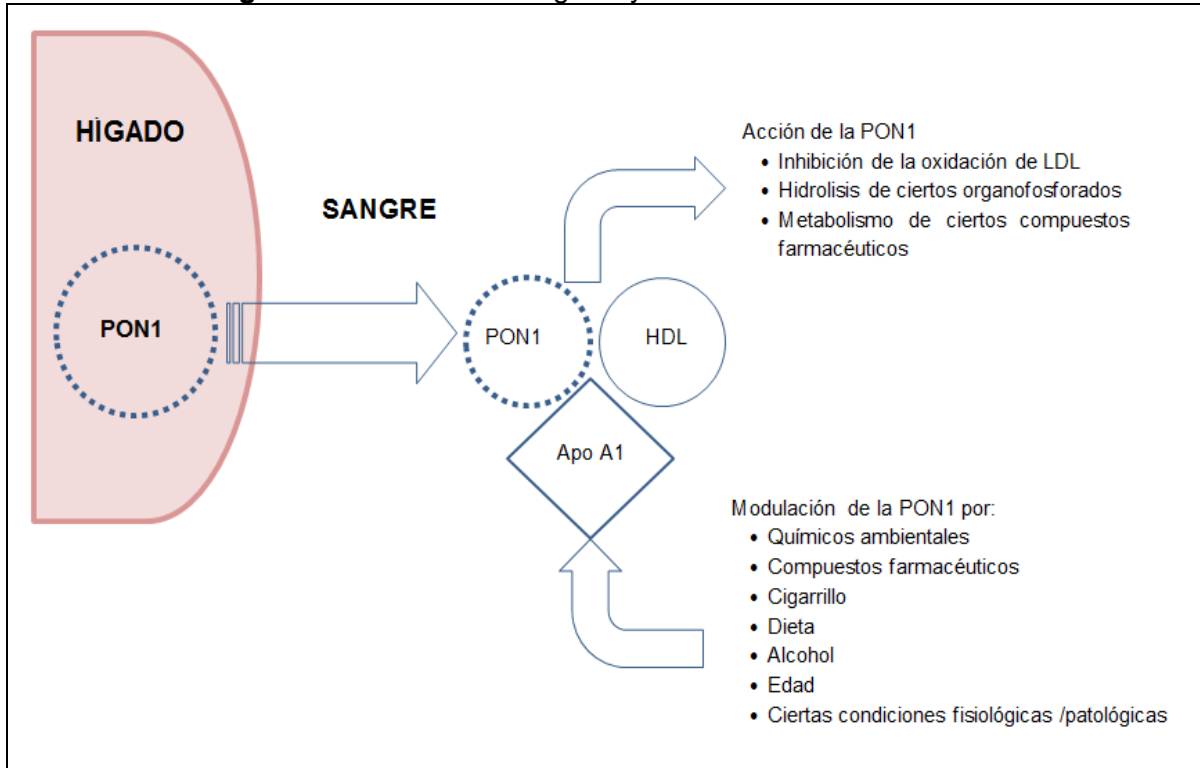
Fuente: Androutsopoulos et al, 2011.

2.3.3 Moduladores de la actividad de PON1

Son numerosos los factores que afectan la actividad de PON1 en los individuos, estos principalmente se deben a los polimorfismos del gen que codifica a la enzima, sin embargo también se presenta una contribución de otros factores de modulación de la actividad de PON-1 los cuales pueden llegar a ser importantes, dentro de estos se pueden resaltar medicamentos, medio ambiente, y factores dietéticos, edad, ciertas enfermedades, género, estrés oxidativo, fosfolípidos oxidados en LDL y HDL, consumo

de alcohol, tabaquismo y la actividad física (Figura 2-10). La actividad de PON1 varía con la edad, es más baja en niños, alcanza su mayor nivel en adultos jóvenes y declina en adultos mayores y en mujeres después de la menopausia. El estrés oxidativo ejerce un fuerte impacto, pudiendo conducir a la inactivación de la enzima (Lucio G Costa, Vitalone, et al., 2005; Fridman et al., 2011).

Figura 2-10. Efectos biológicos y modulación de la PON – 1

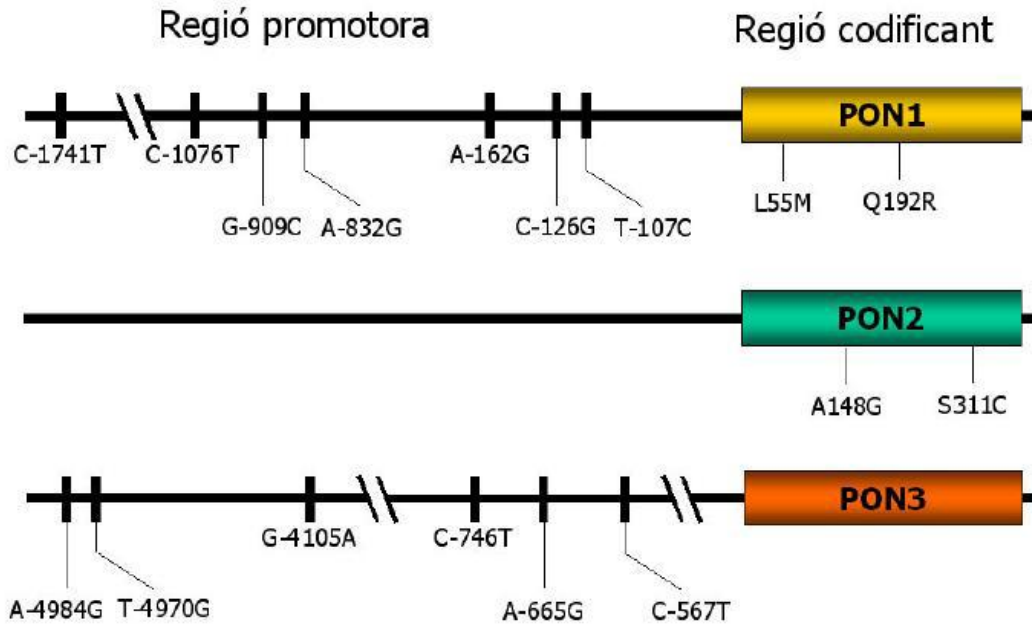


Adaptada de Costa et al., 2005

2.3.4 Polimorfismo de Paraoxonasa (PON-1)

El gen que codifica la enzima PON-1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 7 (7q21.3) sitio conocido por ser polimórfico y se localiza entre los pares de bases 94.571.639 y 94.598.495, y está formado por 26.856 pdb (Figura 2-11). Existe una considerable variación interindividual en la actividad plasmática de PON-1 y esto está determinado en parte, genéticamente (Fridman et al., 2011; Pérez Parra, 2009).

Figura 2-11. Representación esquemática de los polimorfismos más prevalentes para PON1, PON2 y PON3



Fuente: Pérez Parra, 2009

La clonación del gen en 1993 permitió la identificación de más de 200 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) en diferentes regiones del gen PON-1. Hasta el momento se han identificado siete polimorfismos principales en el gen de la PON1 que se encuentran en las regiones codificantes y reguladoras (ver tablas 2-3 y 2-4) (H. Cataño et al., 2005; Fridman et al., 2011; Min et al., 2006; Nus et al., 2008; Pasdar et al., 2006; Povey, 2010).

Tabla 2-3. Polimorfismos en la región reguladora

| Posición | Sustitución | Observaciones |
|----------|------------------------------|--|
| -909 | Guanina (G) por citosina (C) | Este polimorfismo no parece afectar a la expresión de la actividad arilesterasa de forma independiente, pues presenta un desequilibrio de enlace con el resto de los polimorfismos |
| -832 | Adenina (A) por (G) | Los individuos con el polimorfismo -832A presentan una mayor actividad arilesterasa y una mayor concentración de PON1 que los individuos -832G. |
| -162 | A por G | Se ha observado una mayor actividad arilesterasa en los individuos que presentan A en lugar de T. Esta diferencia de actividad es menor que para el polimorfismo de la posición -108, pero está muy poco influenciada por el desequilibrio de enlace con los nucleótidos de las posiciones 55 y 192. |
| -126 | C por G | No se ha observado ningún efecto significativo sobre la actividad arilesterasa. |

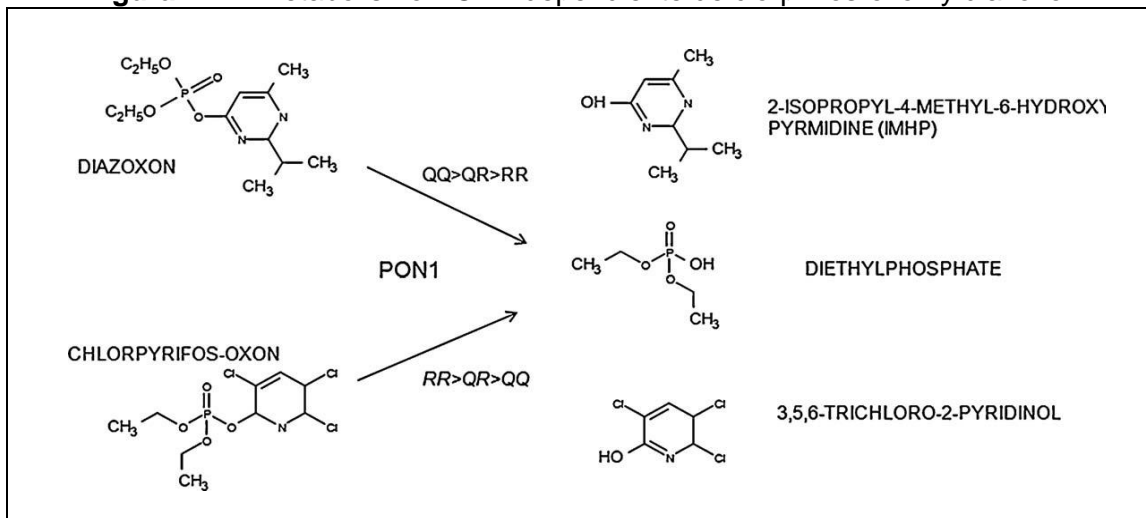
| | | |
|-------------|------------------|---|
| -108 | C por timina (T) | Se ha observado una mayor actividad arilesterasa para el haplotipo C que para el T, pero parte de esta diferencia es debida en un 6% al polimorfismo 192 y en un 4% al polimorfismo 55 de la región codificadora. Se trata de una posición muy importante para la expresión de PON1 en humanos, seguramente porque está asociado al sitio de unión del factor de transcripción SP1. |
|-------------|------------------|---|

Fuente: (Nus et al., 2008)

Tabla 2-4. Polimorfismos en la región codificadora

| Posición | Sustitución | Observaciones |
|------------|---|---|
| 55 | TTG → ATG Leucina(L) → Metionina (M) | Se cree que afecta en general la actividad de la PON-1 debido a las cantidades variables de expresión de la proteína, pero no tienen un impacto directo PON-1 la eficiencia enzimática. El genotipo PON-1 MM55 se asoció con una menor actividad PON-1 debido a la menor cantidad de ARNm y, por tanto, disminuye la cantidad de PON-1 para la síntesis de proteínas (Matthews et al., 2011; Sirivarasai, Kaojarern, Yoovathaworn, & Sura, 2007) |
| 192 | CAA → CGA Glutamina (Q) → Arginina (R) | Se produce una sustitución de una glutamina (Q) por una arginina (R) dando lugar a isoenzimas de baja y alta actividad respectivamente, cuando se utilizó paraxon como sustrato. El polimorfismo 192 Q/R afecta la actividad catalítica de PON1 hacia los organofosforados, siendo el factor determinante principal de la sensibilidad o resistencia a la toxicidad. de un individuo (Androutsopoulos et al., 2011; Gamboa et al., 2008; Lacasaña et al., 2010; Singh, Kumar, Vashisht, et al., 2011; Sirivarasai et al., 2007) |

Al existir un polimorfismo funcional de esta enzima, los individuos con genotipo QQ muestran una menor tasa de hidrólisis de los oxones, por lo que en principio serían más sensibles a estos compuestos que los portadores del genotipo RR (figura 2-12). De esta forma, la caracterización del genotipo o fenotipo PON-1 permitiría establecer a priori la mayor o menor sensibilidad de individuos expuestos a algunos organofosforados. En otras palabras, dicho parámetro puede constituir un importante biomarcador de susceptibilidad individual, con importantes aplicaciones a nivel laboral, ambiental e incluso militar. Sin embargo, esto depende del organofosforado al que se esté expuesto, así los portadores PON1-192R presentan una mayor actividad frente al paraoxón y una menor actividad frente a soman y sarín que los portadores PON1-192Q. Eso significa que la PON1 juega un papel destacado en la detoxificación del diazoxón y clorpirifós, pero no del paraoxón (H. C. Cataño et al., 2006; Ferré et al., 2002; A. Hernández et al., 2007; Min et al., 2006; Nus et al., 2008).

Figura 2-12. Metabolismo PON1-dependiente de clorpirifos-oxon y diazoxon

Fuente: Povey A., 2010

2.3.5 PON-1 y susceptibilidad a los Organofosforados

Diversos insecticidas organofosforotioatos (entre ellos paratión, clorpirifós, diazinón) siguen una vía metabólica en dos pasos, que incluyen una bioactivación del compuesto original por el sistema microsomal CYP450 y la posterior hidrólisis del metabolito oxigenado (oxón) por las paraoxonasas hepática y sérica. Los oxones de organofosforados son sustratos para la enzima paraoxonasa (PON1) del plasma, y esto da como resultado la desintoxicación como parte del metabolismo de fase 1 hepático. La hidrólisis se presenta en el enlace éster aril (Oxon) o enlace O= P. Esta descomposición es de interés puesto que se presenta en los organofosforados antes de la unión con las colinesterasas y posteriormente se hidroliza en metabolitos específicos en particular DEP (fosfato de dietil), TCP (tricloropiridinol), MHP (metil pirimidinol) y PNP (para-nitrofenol). La importancia de la PON1 en la prevención de la toxicidad de los organofosforados se desprende de los informes que muestran que los ratones que carecen de PON-1 eran más susceptibles a clorpirifos-Oxon y que los ratones de tipo salvaje al diazoxón (Androutsopoulos et al., 2011; Canales & Sánchez-Muniz, 2003; Povey, 2010).

Los polimorfismos moleculares de la paraoxonasa sérica humana, tienen el potencial de ser determinantes de la toxicidad variable de organofosforados en las personas, además los genotipos y las actividades relacionadas con la enzima PON 1 se han asociado con numerosas enfermedades humanas como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, trastornos reproductivos, y las enfermedades cardiovasculares (Gupta, Gill, & Singh, 2009; Matthews et al., 2011; Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011; Singh, Kumar, Vashisht, et al., 2011). En cuanto a la relación la PON-1 y la toxicidad por plaguicidas organofosforados se han realizado varios estudios con personas expuestas:

- Lee et al observaron que agricultores portadores del alelo Q de PON1 (genotipos QQ o QR) tenían casi 3 veces más probabilidad de presentar sintomatología relacionada con la exposición crónica a plaguicidas con respecto a los agricultores con genotipo RR. Por cual los autores indican que el polimorfismo PON1 parece ser también un importante determinante de la susceptibilidad de los agricultores a la intoxicación crónica por plaguicidas (A. Hernández et al., 2007).
- Browne et al, estudiaron trabajadores con exposición subliminal a organofosforados y encontraron un descenso significativo de la AChE y un aumento compensatorio de la paraoxonasa como consecuencia de dicha exposición (A. Hernández et al., 2007). Ello indica que la PON1 no es sólo un biomarcador de susceptibilidad a organofosforados sino también un biomarcador de exposición, pues los agricultores de invernadero que usan plaguicidas de forma regular tienen una actividad enzimática significativamente más baja.
- Sirivarasai j, et al (2007), realizaron un estudio con el fin de determinar el efecto de los polimorfismos PON-1 en personas expuestas sobre las actividades acetilcolinesterasa, butirilcolinesterasa, paraoxonasa, arilesterasa, y diazonasa. Dentro de sus hallazgos mencionan que la actividad de la paraoxonasa sérica fue la que tuvo correlación con los polimorfismos estudiados siendo significativamente diferente entre los distintos genotipos, RR> QR> QQ, LL> LM y 108CC->-108CT> 108TT-, el gen PON1 mostró una amplia variación en la actividad de las enzimas (Sirivarasai et al., 2007).
- Singh S, et al (2011), estudiaron la susceptibilidad de daño en el ADN con relación a los polimorfismos de la PON-1 en 115 trabajadores de India expuestos a organofosforados y un número igual de sujetos controles, encontrando que la actividad PON1 hacia el paraoxón y fenilacetato fue menor en los trabajadores que en los sujetos control. La distribución de los genotipos y frecuencias alélicas de PON1192Q/R y PON155L/M fue similar en los 2 grupos. La actividad de PON1 hacia la paraoxonasa se encontró que era significativamente mayor en los genotipos R/R que en Q/R y menor en Q/Q tanto en trabajadores y sujetos control. De igual forma para PON155LM), la actividad PON1 hacia la paraoxonasa se observó más alta en sujetos con genotipos L/L y más bajo en los individuos con genotipos M/M en ambos grupos. Además los individuos que los expuestos a organofosforados presentaron la actividad paraoxonasa más baja y los genotipos Q/Q y M/M mostraron significativamente un mayor daño del ADN (Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011)

3. Objetivos

3.1 General

Caracterizar de la actividad enzimática y polimorfismos genéticos de la paraoxonasa-1 (PON-1), en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados de una empresa productora de agroquímicos del municipio de Soacha – Cundinamarca, en el año 2014.

3.2 Específicos

1. Determinar la actividad enzimática de la paraoxonasa 1 en trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados
2. Determinar los polimorfismos genéticos en las posiciones 55 y 192 de la región codificadora del gen PON1 en trabajadores expuestos a organofosforados.
3. Identificar los polimorfismos de la PON-1 en las posiciones 55 y 192 con base en la secuenciación del fragmento de la región codificante.
4. Establecer la correlación entre los resultados de actividad enzimática y polimorfismos genéticos de la paraoxonasa 1 en la población estudiada.

4. Metodología

4.1 Tipo de estudio

Este trabajo de investigación es de tipo exploratorio, descriptivo y de corte transversal, donde se buscó determinar la actividad de la enzima paraoxonasa 1 (PON-1) y los polimorfismos del gen en un grupo de individuos expuestos ocupacionalmente a plaguicidas organofosforados, usando como control a un grupo de individuos no expuestos a este tipo de productos.

4.2 Descripción Población de Estudio

4.2.1 Individuos ocupacionalmente expuestos a organofosforados

La población que formó parte del presente estudio la conformaron individuos ocupacionalmente expuestos a plaguicidas organofosforados, los cuales laboraban en una empresa productora de plaguicidas del municipio de Soacha Departamento de Cundinamarca, realizando actividades como formulación, mezcla, empaque y adecuación final de plaguicidas organofosforados. En las instalaciones de la empresa productora de plaguicidas se socializó el proyecto con aproximadamente 70 individuos, de los cuales 43, accedieron voluntariamente a participar en el proyecto y firmaron el consentimiento informado (Anexo 1).

Dentro de los acuerdos establecidos con la Empresa productora de plaguicidas, se firmó un acuerdo de confidencialidad entre los grupos de investigación: Grupo Farmacogenética de la Facultad de Ciencias- Grupo Toxicología Ambiental y Ocupacional (TOXICAO) de la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se acordó mantener en reserva el nombre de la empresa y se definió como “trabajadores expuestos” a los operarios, supervisores e ingenieros que laboran en la planta de producción.

4.2.2 Individuos Control

Dentro del proyecto de planteo contar con un grupo de individuos seleccionados a partir de la población general que no estuvieran expuestos a plaguicidas organofosforados que

tuvieran el mismo rango de edad, género y características socioeconómicas, culturales y educacionales que el grupo de trabajadores expuestos. Se socializó el estudio a 100 individuos, de los cuales 40 decidieron participar del proyecto y procedieron con la firma del consentimiento informado (Anexo 1).

4.2.3 Criterios de inclusión

- Personas mayores de edad (> 18 años)
- Firmar el consentimiento informado para participar en el estudio (Anexo 1).
- Para los individuos del grupo de expuestos
 - Individuos que en su labor diaria se vean expuestos a plaguicidas organofosforados.
 - Ser empleado de la empresa productora de plaguicidas y participar de las actividades de: formulación, mezcla, empaque, adecuación final de plaguicidas, operarios de mantenimiento de equipos y áreas de planta de producción, así como también de los ingenieros y supervisores de planta encargados del control de calidad de los procesos de producción.
- Para los sujetos del grupo de control
 - Tener el mismo rango de edad, género y características socioeconómicas, culturales y educacionales que el grupo de trabajadores expuestos (rango de edad).

4.2.4 Criterios de exclusión

- Edad menor de 18 años
- Rehusarse a participar
- Diligenciamiento incompleto y/o sin firma del consentimiento informado
- Para los individuos del grupo de expuestos
 - No laborar en las áreas de producción de empresa
- Para los individuos del grupo de control
 - Estar expuestos directa o indirectamente a plaguicidas organofosforados y otros plaguicidas inhibidores de colinesterasa.

4.3 Reclutamiento de los voluntarios

En la socialización del proyecto que se realizó tanto a individuos ocupacionalmente expuestos como a los del grupo control se les dio a conocer los objetivos del estudio, su carácter de voluntarios y los riesgos que se podían presentar por los procedimientos aplicados procediendo luego a la firma del consentimiento informado, de acuerdo a lo establecido en Resolución No 008430 del 4 de octubre de 1993 expedida por el Ministerio de Salud, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Posteriormente se pidió a los que decidieron ser voluntarios que completaran un cuestionario (anexo 2) que incluyó entre

otros datos personales (edad , sexo), demográficos (peso y altura corporal, exposición a rayos X, medicamentos), estilo de vida (tabaquismo, alcohol) , informes de enfermedades (de cualquier tipo de enfermedad aguda y crónica), síntomas de toxicidad (debido a la exposición crónica por plaguicidas), y por ultimo información relacionada con la ocupación (horas de trabajo/día , años de exposición, uso de medidas de protección, tipo de exposición, etc.) (Ver figura 4-1).

4.4 Obtención de las muestras

Las muestras sanguíneas se recolectaron durante el periodo comprendido entre Enero a Abril del 2014, en el área de enfermería de la empresa productora de plaguicidas (expuestos) y en las instalaciones del Instituto De Biotecnología de la Universidad Nacional (controles) con la ayuda de una bacterióloga.

De cada individuo se obtuvo una muestra de sangre (~10 mL) de 12 horas de ayuna la cual fue recogida por punción venosa y trasferida a 2 tubos vacutainer esteriles, uno sin anticoagulante (tapa roja) para el análisis de la actividad enzimática paraoxonasa (PONasa) y otro con anticoagulante EDTA (venojet Beckton Dickenson) para la determinación de los polimorfismos 55 y 192 de la PON-1.

Todas las muestras fueron codificadas y marcadas con el nombre del individuo, estas fueron almacenadas y trasportadas al laboratorio del Instituto de Biotecnología para su análisis, garantizando la cadena de frio para la preservación de las muestras y se procesaron dentro de las cinco horas de recogida de muestras.

Figura 4-1. Esquema de obtención y tratamiento de la muestra



4.5 Fase pre-analítica

4.5.1 Separación del suero

El mismo día de la colecta, la sangre se centrifugo a 3000 rpm por 10 minutos obteniéndose así el suero, el cual se dividió en 2 alícuotas para las determinaciones de la actividad enzimática las muestras se congelaron a -20°C y a -80°C hasta el momento de la realización de los análisis.

4.5.2 Extracción de ADN

- **Procesamiento de muestras**

Las muestras con anticoagulante fueron centrifugadas a 3000rpm, durante tres minutos a temperatura de 4°C , con el fin de separar la capa de células blancas, las cuales fueron transferidas a un tubo tipo eppendorf de 2.0mL y se procedió a realizar lavados (~7) con buffer de lisis de glóbulos rojos (NH_4Cl 0,14M NaHCO_3 0,1M)(Morantes Medina, 2014; Pérez, Santana, Argudin, & Gardon, 2007)

- **Digestión con Proteinasa K**

Una vez lisados y eliminados los glóbulos rojos, el pellet de células blancas se resuspendió en 200 μL de buffer de digestión (tris-HCl 50mM pH 8,0; acetato de calcio 2 mM) y 10 μL de proteinasa K (20 mg/mL). Esta mezcla se agitó con vórtex mixer y luego se mantuvo a 55°C por una hora. Pasado este tiempo se detuvo la reacción inactivando la enzima a 95°C por 5 minutos.

- **Extracción ADN - Fenol-Cloroformo-Alcohol - isoamílico (25:24:1)**

Al producto de la digestión se le adicionaron 200 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), luego se agitó por vórtex y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. La fase acuosa se recuperó y se transfirió a otro tubo eppendorf de 1.5 mL, se adicionó 100 μL de cloroformo, nuevamente se centrifugo y se recuperó la fase acuosa.

- **Precipitación del ADN**

Para precipitar el ADN se adicionaron 200 μL etanol absoluto frío y 20 μL volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 5,2), se agitó por inversión y luego se incubó durante toda la noche a -20°C . Transcurrido este tiempo, se centrifugó, se retiró el sobrenadante y el pellet de ADN se lavó con 500 μL de etanol al 75%, nuevamente se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente durante 6 horas.

▪ Resuspensión y Cuantificación del ADN

Para resuspender el ADN, se adiciono 50 μL de agua milliQ y se procedió con la cuantificación empleando Qubit® 2.0 Fluorometer Invitrogen. Y se almacenó a -80°C

4.6 Determinación de la actividad Paraoxonasa

La actividad paraoxonasa sérica (PON-1) usando como sustrato en paraoxon. La formación del cromógeno amarillo paranitrofenol en la hidrólisis enzimática fue seguida espectrofotométricamente a 405 nm. La mezcla de ensayo incluye: Paraoxon 1mM Cloruro de calcio 1 mM en Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8,5, 50 μL de muestra diluida 1:2 en e-serina 10^{-5} M (Akgür, Öztürk, Solak, Moral, & Ege, 2003; Gamboa et al., 2008; A F Hernández et al., 2003; López-Flores et al., 2009).

Procedimiento

- Para cada conjunto de ensayos, se preparó una solución del sustrato paraoxon 1mM diluido en Buffer a partir de una solución de paraoxón de 700 mM diluido en acetona.
- Se incuban 950 μL de esta solución a 37°C por 3 minutos
- La reacción se inicia agregando la muestra a la celda: 50 μL de muestra (suero) diluido 1: 2 con eserina 10^{-5} M).
- Se realizan las lecturas en microceldas desechables, monitorizando el aumento de la extinción a 405 nm (formación de paranitrofenol) a intervalos de 30 segundos durante 3 minutos.
- La hidrólisis no enzimática se corrigió mediante el uso de tampón en lugar de suero y el valor obtenido se usa en los cálculos.

Cálculos:

$$\text{Actividad catalítica } \left(\frac{\text{U}}{\text{L}}\right) = \frac{\Delta A / \Delta t * V}{\epsilon * d * v}$$

Dónde:

- $\Delta A(\Delta t)$: Incremento de la absorbancia (densidad óptica) por minuto
- V : Volumen final en la cubeta
- v : Volumen de la muestra
- ϵ : Coeficiente de extinción molar
- d : Paso óptico de la cubeta
- t : tiempo (minutos)

Esta determinación se realizó en el Laboratorio de Análisis Instrumental del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional en el equipo Thermo scientific evolution 201 UV-VIS spectrophotometer, con sistema peltier PCCU control and cooling unit.

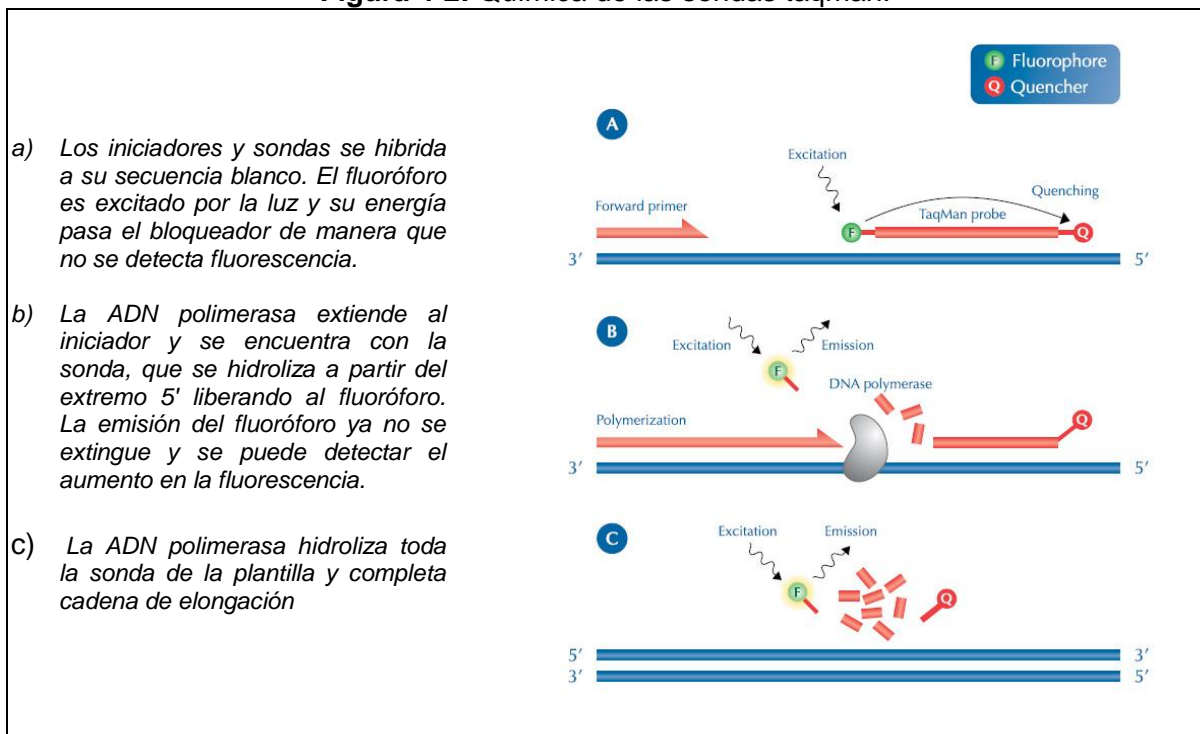
4.7 Determinación de los polimorfismos de la PON-1

El análisis se realizó mediante la técnica PCR-tiempo real con sondas Taqman 5'.

4.7.1 PCR Tiempo Real

La PCR-Tiempo real con sondas Taqman 5' se basa en la actividad exonucleasa de la polimerasa. Las sondas TaqMan son complementarias a los dos alelos de un SNP y cada una tiene un quencher (bloqueador) en su extremo 3' y una molécula fluorescente (HEX, TEX, Cy-5 y FAM) en 5'. Durante la fase de anillamiento extensión, la sonda se hibrida a los amplicones y la DNA polimerasa hidroliza (rompe) el bloqueador, lo que resulta en un incremento de la fluorescencia, como se muestra en la figura 3-2. Esta técnica resulta óptima para estudios que requieran el análisis de muchas muestras para el genotipado.

Figura 4-2: Química de las sondas taqman.



Tomado de: <http://www.thermoscientificbio.com/applications/pcr-and-qpcr/introduction-to-qpcr/>

4.7.2 Diseño de Iniciadores y sondas

Para la determinación de los polimorfismos en las posiciones 55 y 192 del gen de la Paraoxonasa 1 (PON-1) se diseñó del juego de Iniciadores y sondas específicas Taqman que serían utilizadas en la PCR- tiempo real con el fin de tener una mayor confiabilidad en los resultados, para obtener este diseño se hizo necesario realizaren varias etapas sucesivas:

- **Búsqueda en Bases de datos (GenBank)**

Se empleó el banco de secuencias GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para realizar la búsqueda de la secuencia de nucleótidos del gen PON-1 e identificación de los exones donde se encuentran los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) con la identificación exacta del punto en el cual se encuentran los SNPs que son de particular interés en esta investigación (55 y 192). De esta búsqueda se extrajo la información que se presenta en la tabla 4-1:

Tabla 4-1. Resultado de búsqueda en GenBank

| Polimorfismos | PON-1 55 | PON-1 192 |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Código del polimorfismo | Rs854560 | Rs662 |
| Exón | 3 | 6 |
| Tamaño del exón | 156 pb | 296 pb |
| Cambio de base | TTG→ATG | CAA→CGA |
| Cambio de aminoácido | Leucina (L)→Metionina (M) | Glutamina (Q)→Arginina (R) |

- **Diseño de Iniciadores y sondas (Beacon Designer 8,10)**

Se introdujeron estos datos encontrados en GenBank en el software especializado para la obtención de Iniciadores y sondas Beacon Designer 8,10, empleando parámetros restrictivos que permitieran garantizar su especificidad de unión al fragmento de interés y calidad en cuanto a la poca formación teórica de dímeros, entre todos los productos (secuencias de iniciadores y sondas) que estarán incluidos en la reacción. Los datos obtenidos para tamaño del amplicon, posición del polimorfismo, secuencias de iniciadores y sondas se presentan en la tabla 4-2. Posteriormente se realizó análisis del blast (Basic Local Alignment Search Tool) a las secuencias de Iniciadores y sondas obtenidos en el Beacon Designer para compararlas contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos con el fin de asegurar que fueran específicos para la región que se pretendía amplificar.

- **Determinación de Fluoroforos para las sondas**

La selección de los colorantes a emplear en cada sonda taqman diseñada se realizó verificando que fueran idóneos para la tecnología empleada, con el propósito de asegurar la compatibilidad de las sondas diseñadas con los filtros específicos en la que se realizan las lecturas de las muestras. Para determinar los fluorocromos a utilizar se determinó las longitudes de onda de cada uno de los filtros de excitación y emisión del

equipo, y con base a esta información se realizó una búsqueda con los fluorocromos de diferentes proveedores para encontrar las mejores combinaciones con el fin de hacer una RT-PCR.

Tabla 4-2. Iniciadores empleados en la genotipificación del PON-1 55 y 192

| | PON-1 55 | PON-1 192 |
|---------------------------|--|--|
| Tamaño del amplicon | 115 | 114 |
| Posición del SNP | 50 | 48 |
| Iniciador directo (5'→3') | CAACCTGTA CTTTCTGTTCTC | GCACTTTTATGGCACA AATG |
| Iniciador reverso (5'→3') | CACAGAAAAGTGA AAGAAAACA | CGAACTTCACTTGGACTATA |
| Sonda Salvaje | 5' 6-FAM- CTCTGAAGACTTGGAGATACTGCCT - 3' Black Hole Quencher® 1 | 5' Cy5 - ACCCCTACTTACGATCCTGGGAG 3' Black Hole Quencher® 2 |
| Sonda Mutante | 5' TEX 615 - CTCTGAAGACATGGAGATACTGCCT - 3' Black Hole Quencher® 2 | 5' HEX - ACCCCTACTTACAATCCTGGGAG - 3' Black Hole Quencher® 1 |

4.7.3 Estandarización de Iniciadores - PCR convencional

La PCR convencional se realizó para comprobar que el diseño establecido para los Iniciadores permitiera la amplificación de los fragmentos de interés, evitando la formación de dímeros.

▪ Mezcla de reacción

Se emplearon las concentraciones de los reactivos como vienen en el kit comercial Master Mix (adquirido para realizar la PCR en tiempo real) variando la concentración de Magnesio (Mg), para comprobar si la concentración del Kit master mix 3.2 nM impedía o favorecía la amplificación debido a su alta relevancia en la PCR, comparándola contra una concentración de 2.0 nM, la cual es habitualmente usada en el PCR. Ver tabla 4-3.

Tabla 4-3. Mezcla de reacción empleada en la amplificación

| Reactivos | Ci | Condición 1 | | Condición 2 | |
|---------------------------------|----|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | | Cf | Volumen (µL)* | Cf | Volumen (µL)* |
| Buffer [x] | 5 | 1 | 4,0 | 1 | 4,0 |
| MgCl ₂ [mM] | 50 | 2 | 0,8 | 3,2 | 1,3 |
| dNTPs [mM] | 10 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,4 |
| Mezcla de Iniciadores [µM] | 10 | 0,2 | 0,4 | 0,2 | 0,4 |
| Taq [U/µL] <i>Bioline Mango</i> | 5 | 0,05 | 0,2 | 0,05 | 0,2 |
| Templete [ng/µL] | 50 | 10 | 2 | 10 | 2 |
| Agua ** | - | - | 12,2 | - | 11,7 |

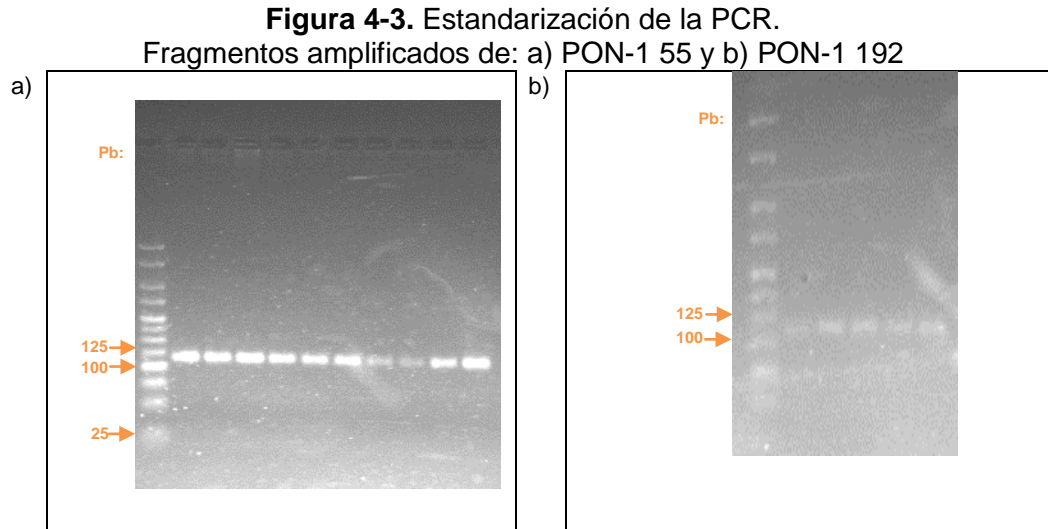
Cantidad por Rx. ** Cada Rx se preparó en un volumen final de 20 µL.

Tabla 4-4. Condiciones de PCR empleadas en la amplificación

| Pasos | Temperatura | Tiempo | Número Ciclos |
|----------------------|--------------------------------|--------|---------------|
| Denaturación Inicial | 95°C | 5 min | 1x |
| Denaturación | 95°C | 30 seg | 30x |
| Anillamiento* | 55.5, 56.0, 58.3, 60.0, 62.3°C | 40 seg | |
| Extensión | 72°C | 30 seg | |
| Extensión Final | 72°C | 5 min | 1x |
| Refrigeración | 4°C | ∞ | 1x |

- Gradiente de temperatura

El termociclador se programó de tal forma que cada una de las reacciones con variación en la concentración de Mg se evaluó a cada una de las temperaturas, incluyendo además una mezcla sin template con el fin de evidenciar si se formaban dímeros de los iniciadores. Como se muestra en la figura 4-3, se obtuvieron amplificados en todas las condiciones probadas.



4.7.4 Estandarización de la PCR en tiempo real

La estandarización de las sondas se realizó mediante PCR en tiempo real con el propósito de determinar las condiciones idóneas para la amplificación del fragmento de interés, la hibridación del mismo con las sondas Taqman diseñadas específicamente para los alelos salvaje y mutante de los polimorfismos 55 y 192 de la PON-1 y finalmente la hidrólisis de las sondas que aleja la del quencher permitiéndole emitir su fluorescencia. Para ello probaron diversas condiciones en las cuales se varió la concentración de las sondas y de los iniciadores las cuales se encuentran en las tablas 4-5 y 4-6.

Tabla 4-5. Condiciones evaluadas para iniciadores y sondas de PCR en tiempo real

| Reactivos | Protocolo Volumen final 10 μ L | | | | | |
|------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Volumen (μ L) | Volumen (μ L) | Volumen (μ L) | Volumen (μ L) | Volumen (μ L) | Volumen (μ L) |
| Master Mix | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Iniciadores 10 μ M | 0,25 | 0,4 | 0,5 | 0,25 | 0,4 | 0,5 |
| Sonda 10 μ M | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| ADN 10nM | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Agua | 3,3 | 3 | 2,8 | 3,1 | 2,8 | 2,6 |

Tabla 4-6. Condiciones de la PCR en tiempo real

| Temperatura | Tiempo | Número Ciclos |
|-------------|--------|---------------|
| 95°C | 5 min | 1x |
| 95°C | 15 seg | 45x |
| 58°C | 1 seg | |
| 40°C | 5 min | 1x |

Una vez se obtuvieron las condiciones óptimas se corrieron las muestras para todos los individuos que participaron en el estudio.

4.7.5 Estimación de Frecuencias Alélicas y Genotípicas para el Gen PON-1

Una vez se realizó el análisis de las muestras, se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas. Las frecuencias genotípicas se calcularon por conteo directo y las frecuencias alélicas se estimaron empleando el método descrito por (Hartl, 2000).

Frecuencia alelo silvestre (p):

$$p = F_{a/a} + \frac{1}{2} F_{a/b}$$

Frecuencia alelo mutado (q):

$$q = F_{b/b} + \frac{1}{2} F_{a/b}$$

Donde;

- $F_{a/a}$ = Frecuencia genotipo homocigótico silvestre
- $F_{b/b}$ = Frecuencia genotipo Homocigóticos mutado
- $F_{a/b}$ = Frecuencia genotipo Heterocigótico

4.7.6 Secuenciación

Para la confirmación de los genotipos se realizó secuenciación del 6 % de las muestras al azar, las cuales antes de ser enviadas a secuenciar se amplificaron por PCR convencional y se verificó la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa como se describió previamente. Estos productos denominados heterocigotos y homocigotos fueron enviados a un servicio externo de secuenciación. El análisis de las secuencias se llevó a cabo empleando los programas Chromas y Bioedit.

4.8 Análisis estadístico

- Análisis descriptivo de cada variable para su caracterización general determinado las medidas de tendencia central y dispersión.
- Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para analizar la homogeneidad de las varianzas de cada una de las muestras comparadas y determinar si los datos eran paramétricos o no paramétricos.

- Para evaluar la relación existente entre variables cuantitativas (actividades paraoxonasa, edad, IMC, etc.) se utilizó el análisis de correlación de Pearson.
- Las diferencias de las actividades de PON-1 entre genotipos fueron evaluados por la prueba de ANOVA o kurskall Wallis.
- Las diferencias entre las medias de los grupos fueron detectados por la prueba t de student.o U Mann-Whitney
- El valor de p menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.
- Los análisis se realizaron con la ayuda de programas estadísticos, Excel 2010, IBM SPSS Statistics 22, Graph.Pad Prism 6, STATAGRAPHICS centurions XV.I.

4.9 Consideraciones Éticas

Para el presente estudio se consideraron las siguientes disposiciones éticas:

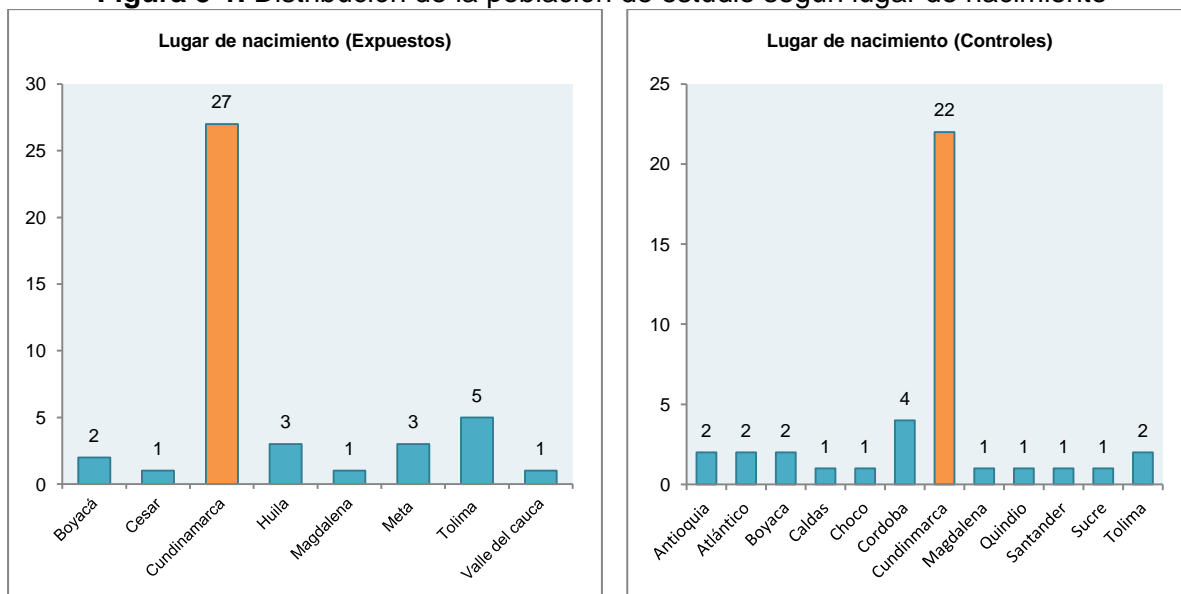
- Las consideraciones éticas del presente proyecto se encuentran contempladas en la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud en Colombia.
- El presente proyecto fue sometido a evaluación por parte del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, el cual aprobó los protocolos y procedimientos empleados en este trabajo en su reunión del día 09 de Agosto de 2012, Acta No. 104 (ver Anexo 3).
- Se solicitó la autorización a los trabajadores participantes en el estudio previa presentación de los objetivos, riesgos y beneficios del proyecto (consentimiento informado).
- Se realizó la socialización de los resultados de la investigación a las empresas que participaron en el estudio.
- Se garantizó que la información suministrada no se diera a conocer y se protegió de manera segura. Se garantizó que el estudio se desarrollara de modo que los procedimientos no afectaron la integridad del participante. Se mantuvo en reserva la información proporcionada.
- Los recursos utilizados para el desarrollo del estudio fueron los justos, acorde a las necesidades del mismo.

5. Resultados

5.1 Características sociodemográficas de la población de estudio

En este estudio participaron en total 83 individuos, distribuidos de la siguiente forma: 40 controles y 43 trabajadores de una empresa productora de plaguicidas (expuestos). Como se evidencia en la figura 5-1, los individuos proceden de diversos lugares del país, siendo Cundinamarca el departamento del cual proviene la mayoría (63% los expuestos y 55% los controles).

Figura 5-1. Distribución de la población de estudio según lugar de nacimiento



Fuente: Encuesta aplicada

En la tabla 5-1 se muestra de manera global las características generales y sociodemográficas de la población.

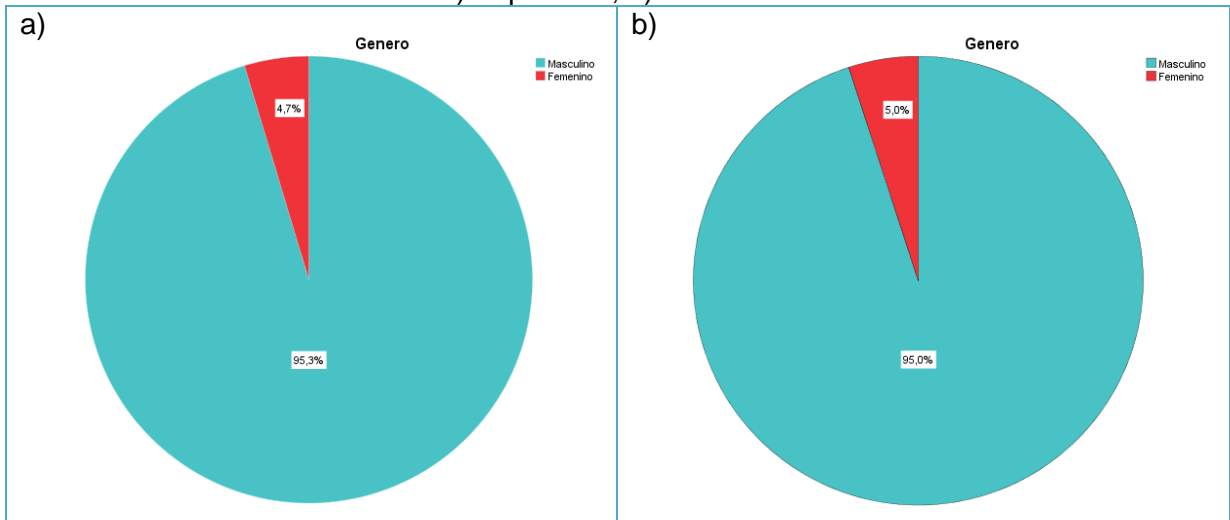
Tabla 5-1. Distribución de la población de estudio según características generales y sociodemográficas

| Variable | Niveles de la variable | Expuestos | | Control | |
|-------------------------------|------------------------|-----------|--------|---------|--------|
| | | n = 43 | % | n = 40 | % |
| Genero | Masculino | 41 | (95,4) | 38 | (95,0) |
| | Femenino | 2 | (4,6) | 2 | (5,0) |
| Edad (años) | ≤20 | 1 | (2,3) | 0 | (0,0) |
| | 21-30 | 13 | (30,2) | 20 | (50,0) |
| | 31-40 | 15 | (34,9) | 12 | (30,0) |
| | 41-50 | 11 | (25,6) | 7 | (17,5) |
| | ≥50 | 3 | (7,0) | 1 | (2,5) |
| IMC (Kg/m²) | ≤18,50 | 1 | (2,3) | 1 | (2,5) |
| | 18,51 – 24,99 | 27 | (62,8) | 25 | (62,5) |
| | 25,00-29,99 | 13 | (30,2) | 12 | (30,0) |
| | ≥30 | 2 | (4,7) | 2 | (5,0) |
| Nivel de estudio | Primaria | 2 | (4,7) | 2 | (5,0) |
| | Secundaria | 31 | (72,1) | 16 | (40,0) |
| | Técnico | 4 | (9,3) | 6 | (15,0) |
| | Tecnológico | 4 | (9,3) | 0 | (0,0) |
| | Profesional | 1 | (2,3) | 10 | (25,0) |
| | Posgrado | 1 | (2,3) | 6 | (15,0) |
| Consumo de alcohol | Si | 39 | (90,7) | 31 | (77,5) |
| | No | 4 | (9,3) | 9 | (22,5) |
| Consumo de cigarrillo | Si | 7 | (16,3) | 11 | (27,5) |
| | No | 36 | (83,7) | 29 | (72,5) |

Fuente: Encuesta aplicada

En cuanto a la distribución por género, la mayoría son hombres que representaron más del 95% de la población, participando solo 4 mujeres en el estudio.

Figura 5-2. Distribución porcentual de la población de estudio según género. a) Expuestos, b) Controles.



Fuente: Encuesta aplicada

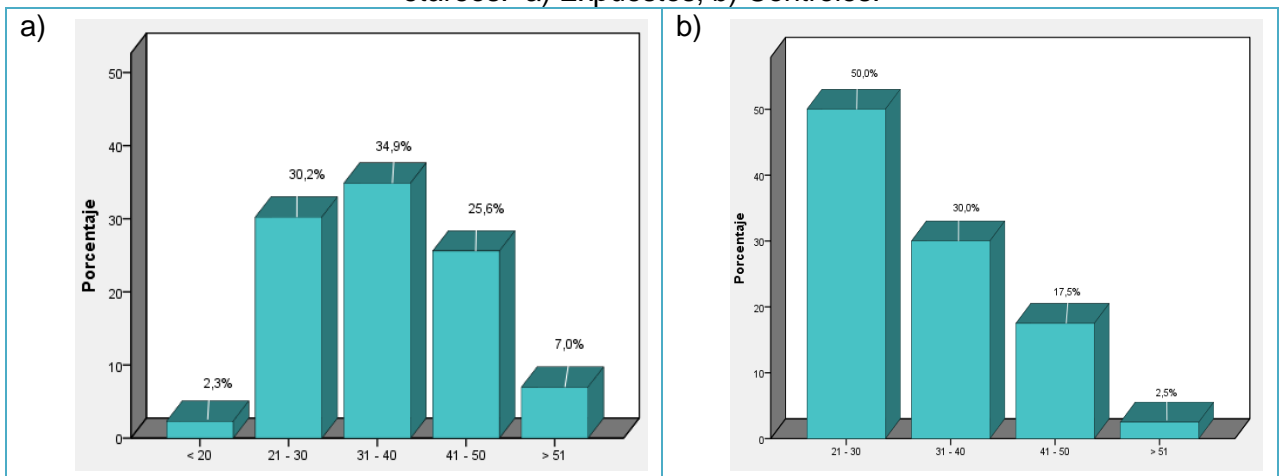
La edad media de todos los individuos estudiados es de 33.9 ± 9.2 años (rango 19-59: n = 83). Aproximadamente el 90% de los expuestos tenían entre 21 y 50 años de edad. No se observaron diferencias significativas entre controles y expuestos para esta variable como se muestra en la tabla 5-2.

Tabla 5-2. Datos descriptivos de Edad

| Variable | Expuestos | Control | p-valor |
|---------------------|-----------|------------|---------|
| | n: 43 | n: 40 | |
| Edad (Años)* | 35,4±9,49 | 32,28±8,65 | 0,1249 |

*: Promedio (\bar{x}) \pm sd

Figura 5-3. Distribución porcentual de la población de estudio según grupos etáreos. a) Expuestos, b) Controles.



Fuente: Encuesta aplicada

El valor medio de Índice de Masa Corporal para todos los individuos fue de $24,10 \pm 3,39$. Más del 60% de los participantes presentó un valor de IMC normal (18,51-24,99), sin embargo aproximadamente el 8% de ellos se encontraban en sobrepeso y obesidad. Como se muestra en la tabla 5-3, no se evidencia diferencia significativa para los valores de IMC entre el grupo control y el de expuestos.

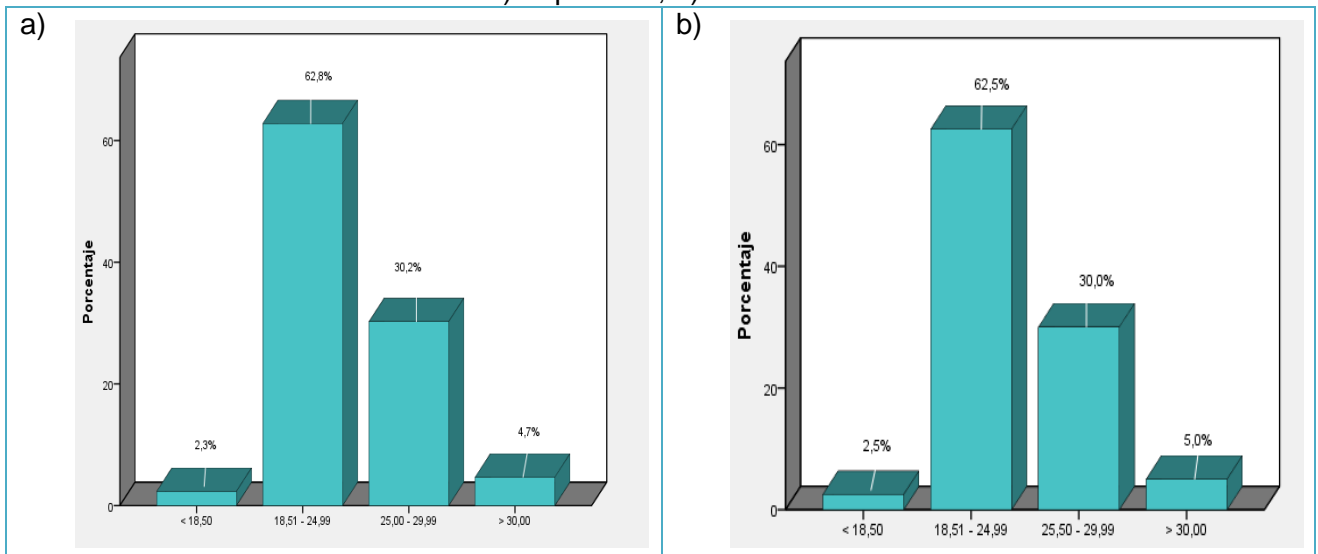
Tabla 5-3. Datos descriptivos del IMC

| Variable | Expuestos | Control | p-valor |
|--------------------------------|------------|------------|---------|
| | n: 43 | n: 40 | |
| IMC (Kg/m²)* | 24,52±3,61 | 23,64±3,12 | 0,240 |

*: Promedio (\bar{x}) \pm SD

Figura 5-4. Distribución porcentual de la población de estudio según el IMC.

a) Expuestos, b) Controles.

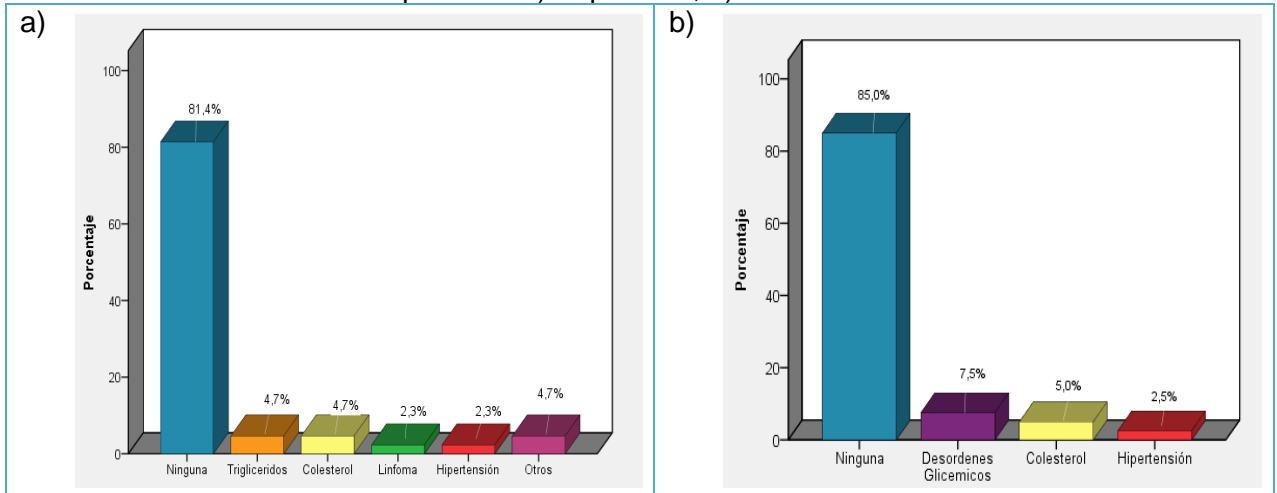


Fuente: Encuesta aplicada

En lo referente al estilo de vida, más del 80% de los participantes en el estudio informo que consumía alcohol con regularidad (mensual y quincenal) y por el contrario el 22% aproximadamente informo que consumía cigarrillo habitualmente.

En la figura 5-5 se presenta la distribución de las enfermedades previas de los participantes, donde se evidencia la que los problemas con la tensión arterial y colesterol son similares en los 2 grupos (aproximadamente 2,4% y 5,0% respectivamente), 3 participantes del grupo control manifestó tener desordenes glicémicos y un participante de los de expuestos informo que tuvo un linfoma tiempo atrás.

Figura 5-5. Distribución porcentual de la población de estudio de acuerdo a sus enfermedades previas. a) Expuestos, b) Controles.



Fuente: Encuesta aplicada

Los datos de relevancia clínica se resumen en la tabla 5-4, el consumo de medicamentos se centró en atorvastatina, naproxeno, tiroxina y vitaminas, en 16 % de los trabajadores y 20 % de los controles. En lo referente a episodios de intoxicación, 14 trabajadores expuestos (32,6 %) informaron haber presentado previamente síntomas relacionados con la exposición crónica y aguda a plaguicidas y dentro del grupo control solo un individuo refirió una intoxicación aguda años atrás.

Tabla 5-4. Datos clínicos de la población

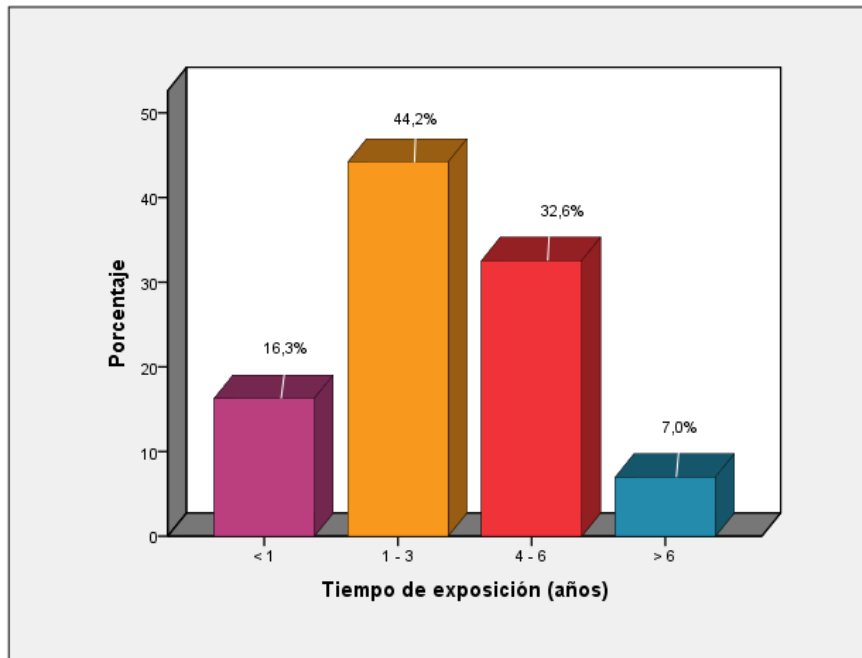
| Variable | Niveles de la variable | Expuestos | | Control | |
|--|------------------------|-----------|--------|---------|--------|
| | | n = 43 | % | n = 40 | % |
| Inconvenientes para tener hijos | Si | 1 | (2,3) | 3 | 7,50 |
| | No | 42 | (97,7) | 37 | 92,50 |
| Consumo de medicamentos | Si | 7 | (16,3) | 8 | (20,0) |
| | No | 36 | (83,7) | 32 | (80,0) |
| Radiografías en el último año | Si | 1 | (2,3) | 11 | (27,5) |
| | No | 42 | (97,7) | 29 | (72,5) |
| Episodios de intoxicación | Si | 14 | (32,6) | 1 | (2,5) |
| | No | 29 | (67,4) | 39 | (97,5) |

Fuente: Encuesta aplicada

5.2 Características Ocupacionales

Los datos ocupacionales de individuos expuestos se presentan en las figuras 5-6 y 5-7, cabe destacar que el tiempo medio de labor en la empresa productora de plaguicidas fue de $3,8 \pm 0,7$ años (rango 0,5-26: $n = 43$). El 16 % de los participantes tenía menos de un año de trabajar en la empresa, 19 de ellos (44,2 %) entre 1 y 3 años y aproximadamente el 40 % informo tener más de 4 años de exposición.

Figura 5-6. Distribución porcentual de los trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados según el tiempo de ejercer el trabajo.

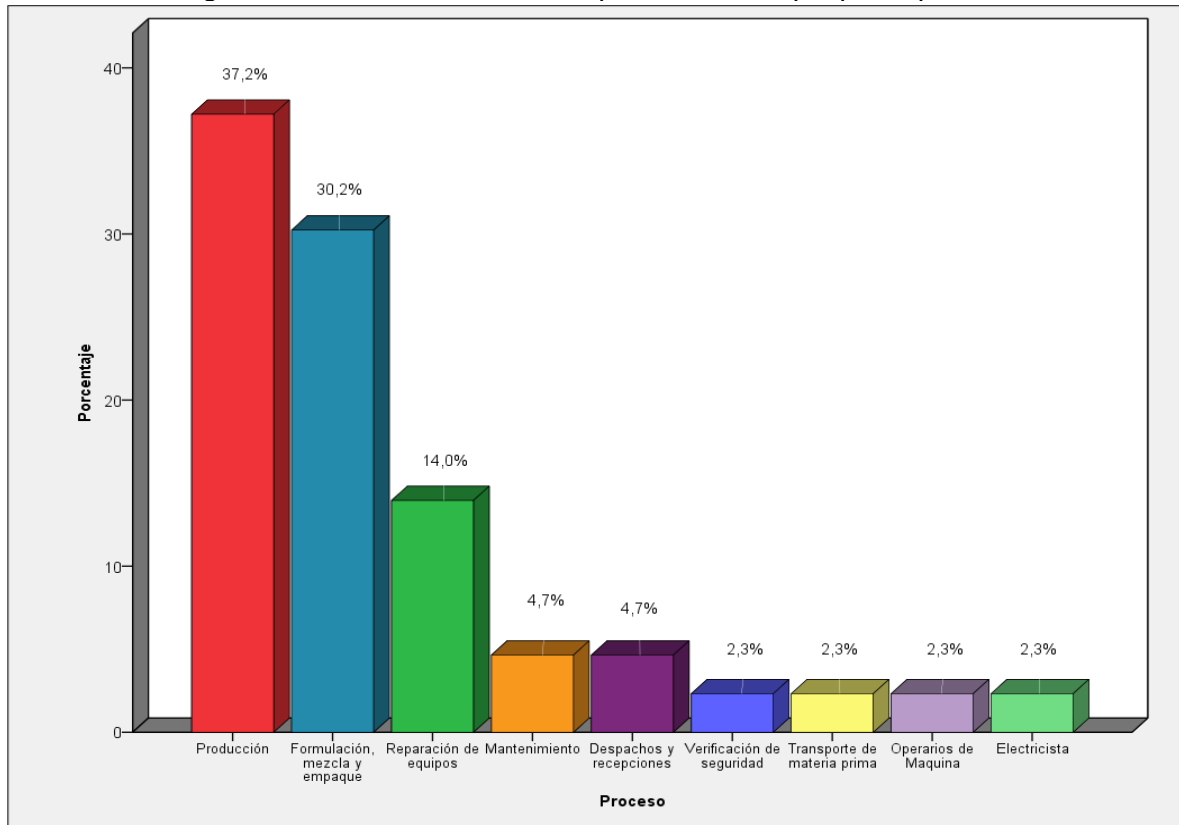


Fuente: encuesta aplicada

De los 43 empleados expuestos a organofosforados más del 35% participa en los procesos de producción, formulación, mezcla y empaque.

Al trabajar todos los individuos expuestos en la misma empresa productora de plaguicidas se prestó que para algunos de los parámetros evaluados en la encuesta obtuvo las mismas respuestas, es así que en lo referente al uso de elementos de protección personal todos los individuos utilizan durante su jornada de trabajo mascara gafas y guantes. Los overoles de dotación se lavan en la empresa y los empleados se duchan al finalizar la jornada laboral.

Figura 5-7. Distribución porcentual de los trabajadores expuestos a plaguicidas organofosforados de acuerdo al proceso en el que participan.



Fuente: Encuesta aplicada

En lo referente a los plaguicidas organofosforados a los que estaban expuestos el grupo de trabajadores, en la tabla 5-5 se presenta el listado de principios activos de organofosforados que se utilizan en la empresa productora de plaguicidas.

Tabla 5-5. Listado de plaguicidas organofosforados elaborados en la empresa

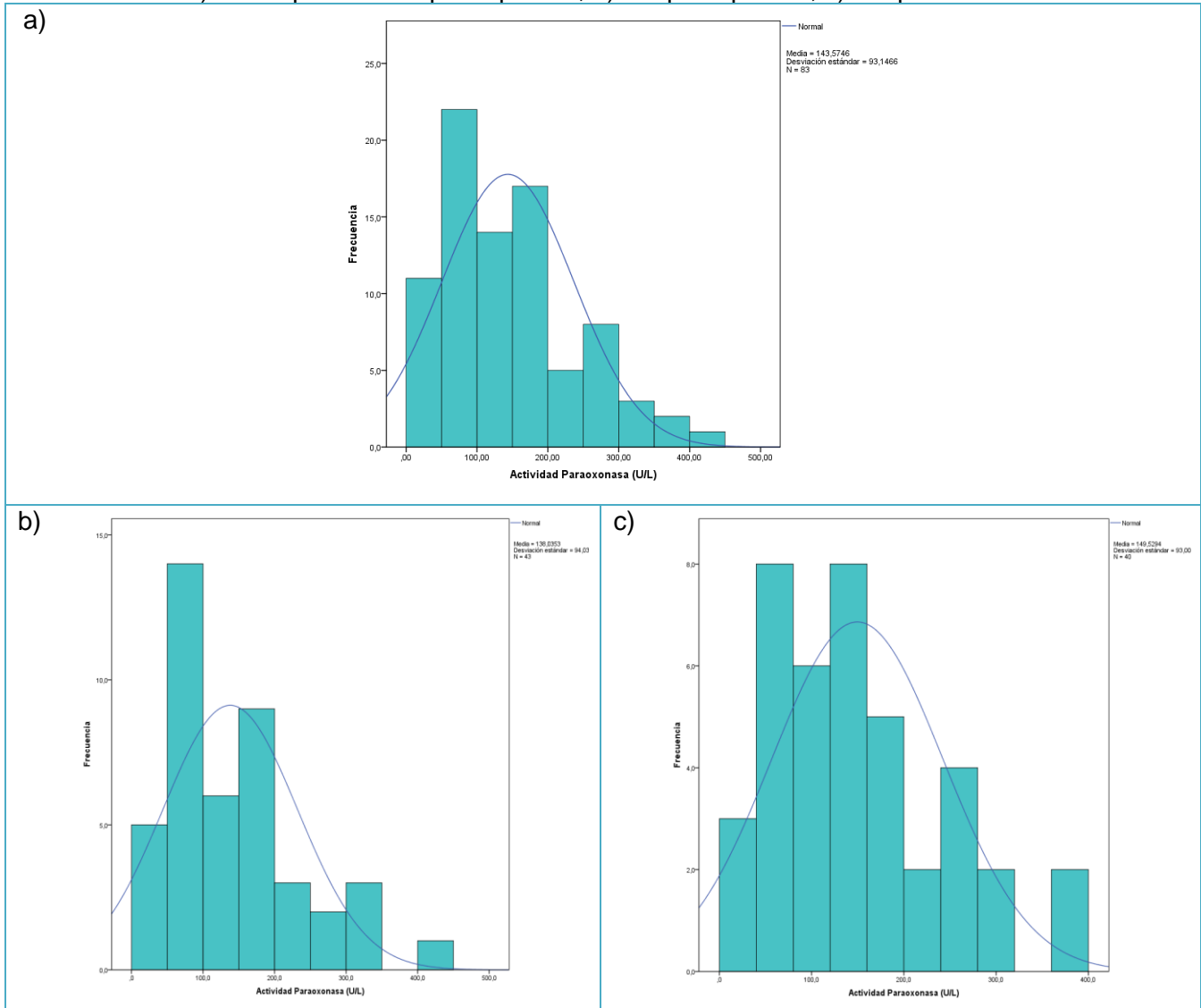
| |
|-------------|
| Acefato |
| Triclorfon |
| Temefos |
| Malation |
| Clorpirifos |

Fuente: <http://www.ica.gov.co/>

5.3 Actividad Paraoxonasa

El valor medio de la actividad paraoxonasa (U/L) en la población estudiada fue de $143,46 \pm 95,10$ (rango 27,39 – 424,61; $n=83$). La distribución de los datos no cumplió con los parámetros de normalidad según la prueba de Shapiro-Wilk, como se observa en los respectivos histogramas de frecuencias.

Figura 5-8. Histograma de frecuencia de la actividad paraoxonasa (U/L).
a) Datos para los 83 participantes; b) Grupo expuesto; c) Grupo control.



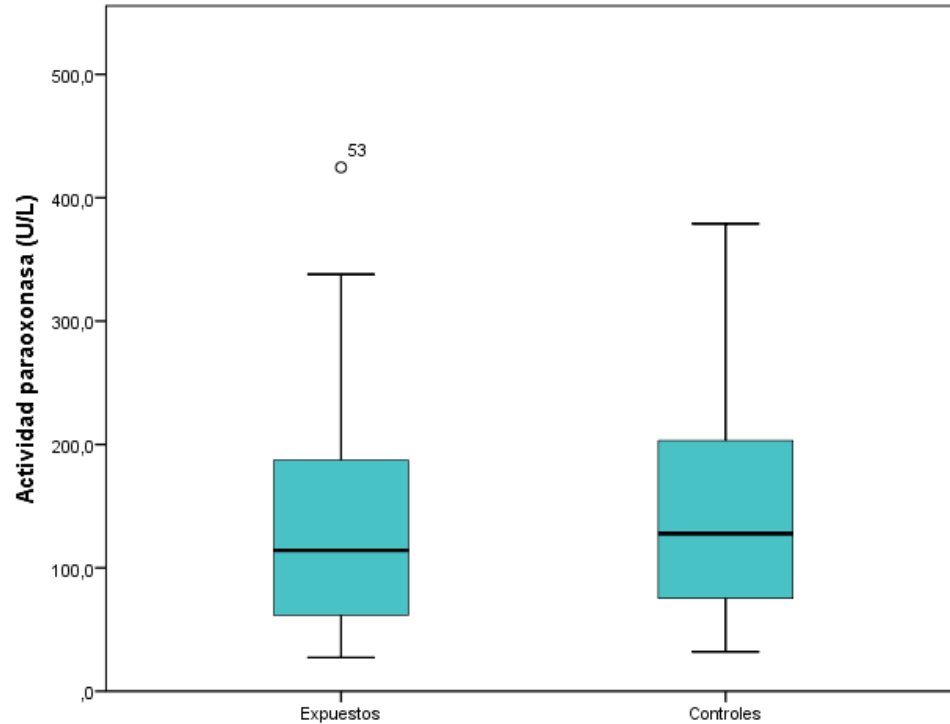
Fuente: Resultados de la investigación

La media de valores de actividad paraoxonasa fue más alta en el grupo de referencia que en el grupo de trabajadores ($149,52 \pm 93,00$ y $138,04 \pm 94,0$ U/L respectivamente), sin embargo, como se muestra en tabla 5-6 y en la figura 5-9, no se encontró diferencia significativa para entre los grupos.

Tabla 5-6. Datos descriptivos de la actividad paraoxonasa en la población estudiada

| Grupo | n | Actividad paraoxonasa (U/L)* | Rango | P-Valor** |
|------------------|----|------------------------------|----------------|-----------|
| Expuestos | 43 | 138,04 ± 94,0 | 27,39 - 424,61 | 0,5092 |
| Control | 40 | 149,52 ± 93,00 | 31,96 - 379,0 | |

*: Promedio (\bar{x}) ± SD; **: U Mann-Whitney.

Figura 5-9. Diagrama de cajas y bigotes para actividad paraoxonasa (U/L)

Fuente: Resultados de la investigación

Se realizó un análisis de correlación entre la actividad paraoxonasa y de las variables cuantitativas incluidas en la encuesta (edad, IMC, años de exposición), con el fin de conocer cómo se relaciona cada par de variables y la dirección y significancia de dicha relación (tablas 5-7 y 5-8), es así que la actividad paraoxonasa, no presentó una correlación significativa con las variables estudiadas pero sí hubo correlación en los trabajadores entre la edad y los años de exposición e IMC ($r = 0,509$ y $r = 0,357$) respectivamente. La edad y el IMC también estuvieron correlacionadas en el grupo control ($r = 0,382$).

Tabla 5-7: Análisis de correlación entre variables cuantitativas en los individuos expuestos a organofosforados

| | Actividad Paraoxonasa | Años de exposición | Edad | IMC |
|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------|-----|
| Actividad Paraoxonasa | 1 | | | |
| Años de exposición | -0,140 | | | |
| Edad | -0,035 | 0,509** | 1 | |
| IMC | -0,186 | 0,083 | 0,357* | 1 |

*: Correlación significativa en el nivel 0,05.

Fuente: Resultado de la investigación

Tabla 5-8: Análisis de correlación entre variables cuantitativas en grupo control

| | Actividad Paraoxonasa | Edad | IMC |
|-----------------------|-----------------------|--------|-----|
| Actividad Paraoxonasa | 1 | | |
| Edad | 0,189 | 1 | |
| IMC | 0,117 | 0,382* | 1 |

*: Correlación significativa en el nivel 0,05.

Fuente: Resultado de la investigación

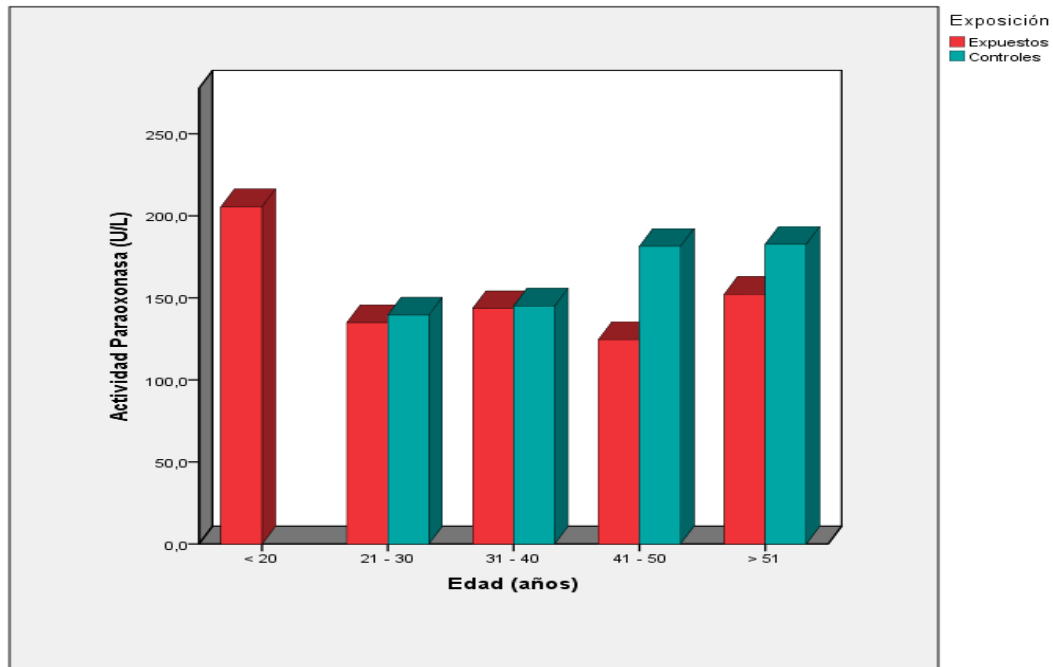
La tabla 5-9 y la figura 5-10 presentan los resultados generados al evaluar los valores de actividad enzimática de acuerdo a grupos etarios para expuestos y controles. Los valores de actividad paraoxonasa fueron similares para ambos grupos en los rangos de edades de 21 a 30 años y 31 a 40 años. Los valores más altos se encontraron en el grupo control para los rangos de 41 años en adelante, sin embargo no se encontró diferencia significativa al comparar los grupos.

Tabla 5-9. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo a grupos etarios

| Grupo | Edad (años) | | | | p-valor** |
|-------|----------------|----|---------------|----|-----------|
| | Control* | n | Expuestos* | N | |
| < 20 | 0 | 0 | 205,5 | 1 | - |
| 21-30 | 139,5 ± 91,7 | 20 | 134,9 ± 101,7 | 13 | 0,8344 |
| 31-40 | 145,0 ± 90,0 | 12 | 143,4 ± 106,2 | 15 | 0,7096 |
| 41-50 | 181,30 ± 114,0 | 7 | 125,0 ± 88,8 | 11 | 0,2015 |
| >51 | 182,6 | 1 | 152,2 ± 36,9 | 3 | - |

*: Promedio (\bar{x}) ± SD; **: U Mann-Whitney.

Fuente: resultado de la investigación

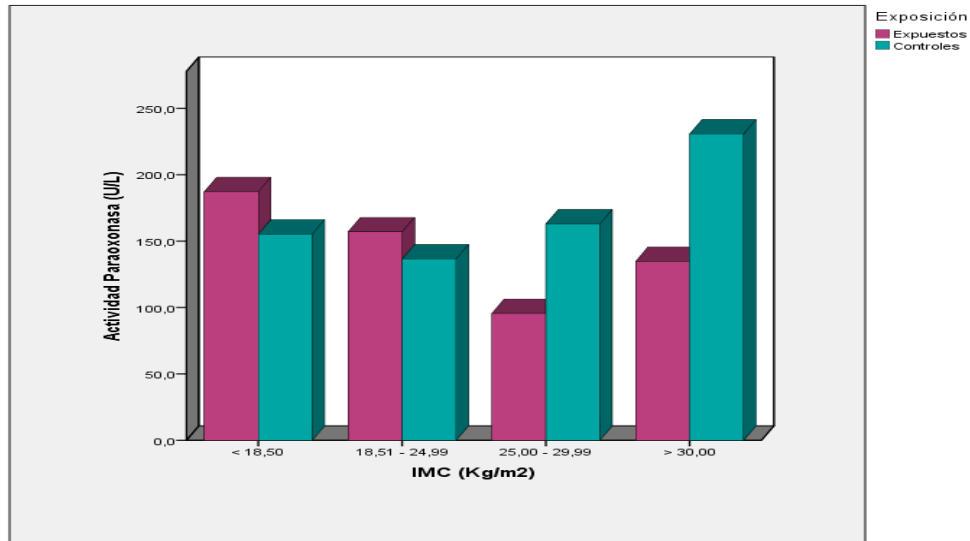
Figura 5-10. Actividad paraoxonasa según grupos etarios

Fuente: Resultados de la investigación

La tabla 5-10 y la figura 5-11 presentan los resultados generados al evaluar los valores de actividad enzimática de acuerdo al IMC. En los individuos con bajo peso y peso normal (IMC < 18,50 y entre 18,51 a 24,99), se encontró que la actividad paraoxonasa era ligeramente superior en el grupo de expuesto con respecto a los controles, pero esta variación no fue significativa. Por el contrario en los individuos con sobrepeso y obesidad (IMC de 25,00 a 29,99 y > a 30) los valores de la actividad fueron superiores para los controles, pero tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos.

Tabla 5-10. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al IMC (Kg/m²)

| Grupo | Edad (años) | | Expuestos* | N | p-valor** |
|-------------|---------------|----|---------------|----|-----------|
| | Control* | n | | | |
| < 18,50 | 155,2 | 1 | 187,2 | 1 | - |
| 18,51-24,99 | 136,4 ± 86,8 | 25 | 156,9 ± 107,7 | 27 | 0,6140 |
| 25,00-29,99 | 162,8 ± 109,7 | 12 | 95,5 ± 52,9 | 13 | 0,1639 |
| >30 | 230,6 ± 67,8 | 2 | 134,7 ± 22,6 | 2 | 0,3333 |

Figura 5-11. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al IMC (Kg/m²)

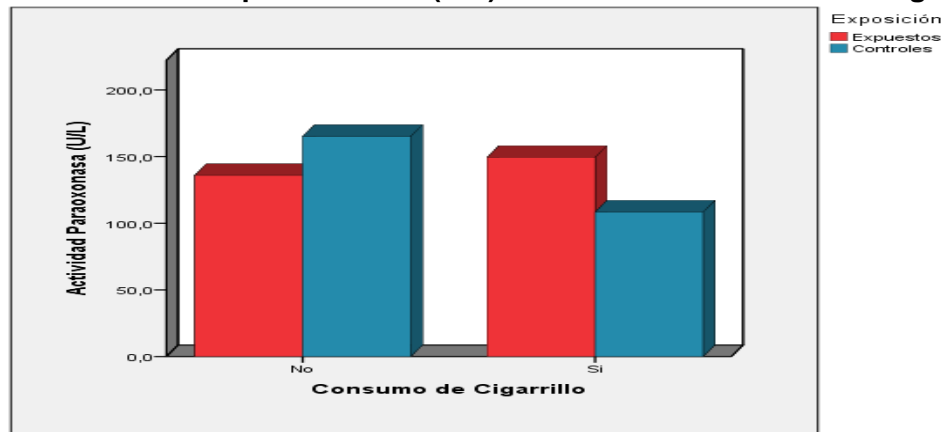
Fuente: Resultados de la investigación

El consumo de cigarrillo no altero los valores de actividad enzimática. En el grupo control se encontraron niveles inferiores de actividad paraoxonasa en los individuos que informaron fumar, pero sin diferencia significativa.

Tabla 5-11. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de cigarrillo

| Grupo | Consumo de cigarrillo | | | | p-valor** |
|-----------|-----------------------|----|---------------|----|-----------|
| | Control* | n | Expuestos* | N | |
| Si | 108,3 ± 75,7 | 11 | 149,4 ± 113,7 | 7 | 0,4926 |
| No | 165,2 ± 95,3 | 29 | 135,8 ± 91,5 | 36 | 0,1578 |
| p-valor** | 0,0564 | | 0,9936 | | |

*: Promedio (\bar{x}) ± SD; **: U Mann-Whitney.

Figura 5-12. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de cigarrillo

Fuente: Resultados de Investigación

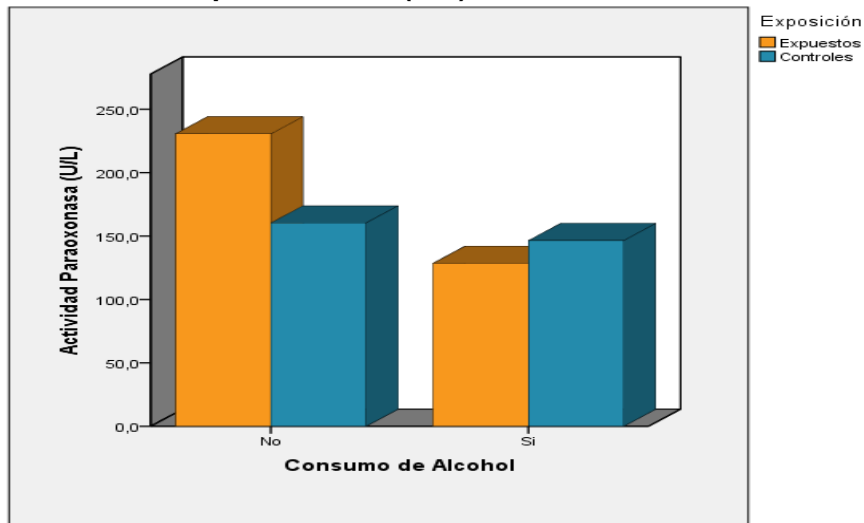
El consumo de alcohol vario significativamente la actividad enzimática en los trabajadores expuestos a organofosforados ($p < 0,005$), pero se encontró esta diferencia al evaluar entre controles y expuestos (tabla 5-12 y figura 5-13).

Tabla 5-12. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de alcohol

| Grupo | Consumo de Alcohol | | | | p-valor** |
|------------------|--------------------|----|---------------------------|----|-----------|
| | Control* | n | Expuestos* | N | |
| Si | 146,4 ± 96,1 | 31 | 128,5 ± 92,3 ^a | 39 | 0,3853 |
| No | 160,3 ± 85,3 | 9 | 230,6 ± 56,8 ^b | 4 | 0,1133 |
| p-valor** | 0,5714 | | 0,0177 | | |

*: Promedio (\bar{x}) ± SD; **: U Mann-Whitney. La diferente letra suscrita revela diferencia significativa ($p < 0,05$).

Figura 5-13. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de alcohol



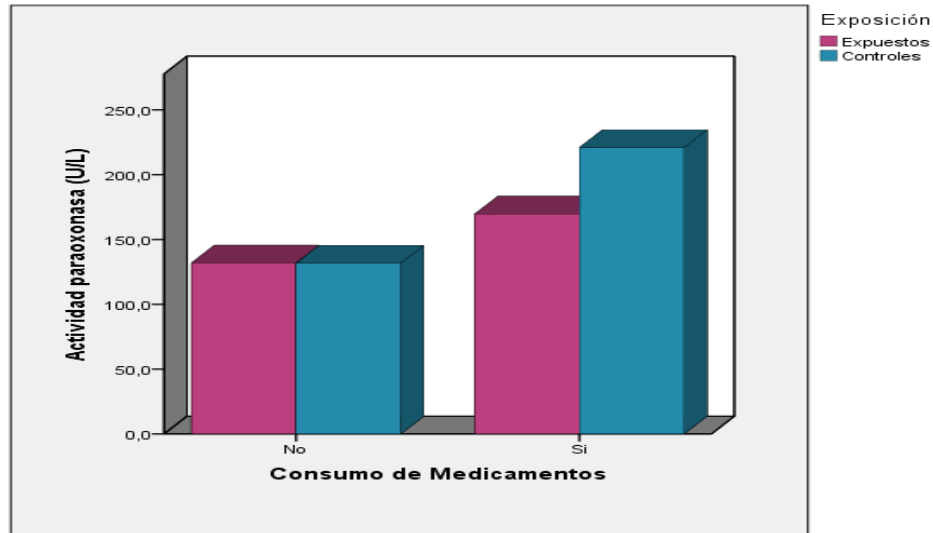
Fuente: Resultados de investigación

Como se muestra en la tabla 5-13, los valores de actividad paraoxonasa fueron superiores en aquellos individuos que declararon estar consumiendo medicamentos en ambos grupos ($220,9 \pm 121,7$ y $169,6 \pm 64,81$, para controles y expuestos respectivamente) y en el grupo de control se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla 5-13. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de medicamentos

| Grupo | Consumo de medicamentos | | | | p-valor** |
|------------------|-------------------------|----|---------------|----|-----------|
| | Control* | n | Expuestos* | N | |
| Si | 220,9 ± 121,7 | 8 | 169,6 ± 64,81 | 7 | 0,4507 |
| No | 131,7 ± 76,78 | 32 | 131,9 ± 98,25 | 36 | 0,6359 |
| p-valor** | 0,0454 | | 0,1174 | | |

*: Promedio (\bar{x}) ± SD; **: U Mann-Whitney. La diferente letra suscrita revela diferencia significativa ($p < 0,05$).

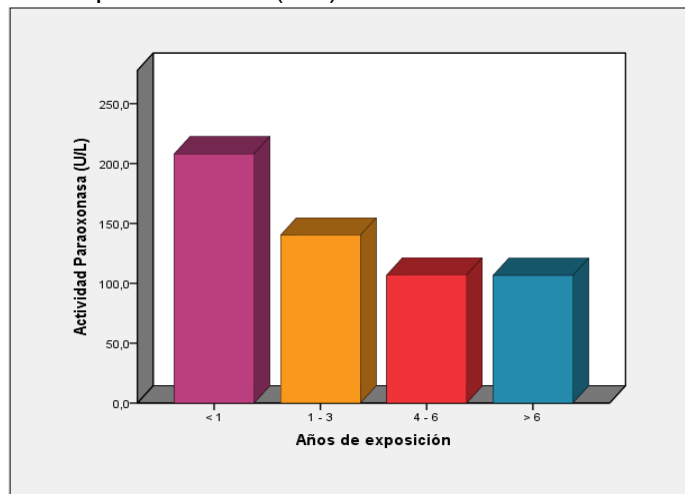
Figura 5-14. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo al consumo de medicamentos

Fuente: Resultado de la investigación

En el grupo de trabajadores se evaluó los años de ejercer su labor en la empresa productora de plaguicidas con relación a los valores de actividad paraoxonasa (tabla 5-14 y figura 5-15), encontrándose una tendencia de disminución de la actividad a medida que los años de exposición aumentaron (no estadísticamente significativo).

Tabla 5-14. Actividad paraoxonasa (U/L) de acuerdo a los años de exposición

| Grupo | Promedio | n | Rango | P-valor |
|-------|--------------|----|--------------|---------|
| < 1 | 208,1 ± 52,6 | 7 | 50,2 - 424,6 | 0,3574 |
| 1 - 3 | 140,1 ± 85,9 | 19 | 27,4 - 301,3 | |
| 4 - 6 | 107,0 ± 68,0 | 14 | 27,4 - 305,9 | |
| >6 | 106,5 ± 74,4 | 3 | 54,8 - 191,8 | |

*: Promedio (\bar{x}) ± SD; **: Prueba de Kruskal Wallis.**Figura 5-15.** Actividad paraoxonasa (U/L) en relación a los años de exposición a OPs

Fuente: Resultado de la investigación

5.4 Estimación de frecuencias genotípicas y alélicas para el Gen PON-1 en las posiciones 55 y 192

Luego de analizar y comparar las respuestas obtenidas (figura 5-16), se estableció que de las 83 muestras evaluadas, para el alelo PON-1 55L, 21 muestras (25,3%) fueron homocigotas (10 en expuestos y 11 en controles) y 63 (74,7%) fueron heterocigotos (33 en expuesto y 29 en controles) PON-1 55, para el alelo PON-192Q, 73 muestras (88,0%) fueron heterocigotos (38 en los expuestos y 35 en los controles) y 10 muestras (12,0%) fueron homocigotas (5 en los expuesto y 5 en los controles). Ninguna muestra resultó homocigota para los alelos mutados. En la figura 5-17) se registran estos resultados expresados en porcentajes, calculados con respecto al total de muestras analizadas (n=83).

Figura 5-16. Respuesta de Amplificación de las muestras. a) heterocigoto para PON-1 55 LM. b) heterocigoto para PON-1 192 QR.

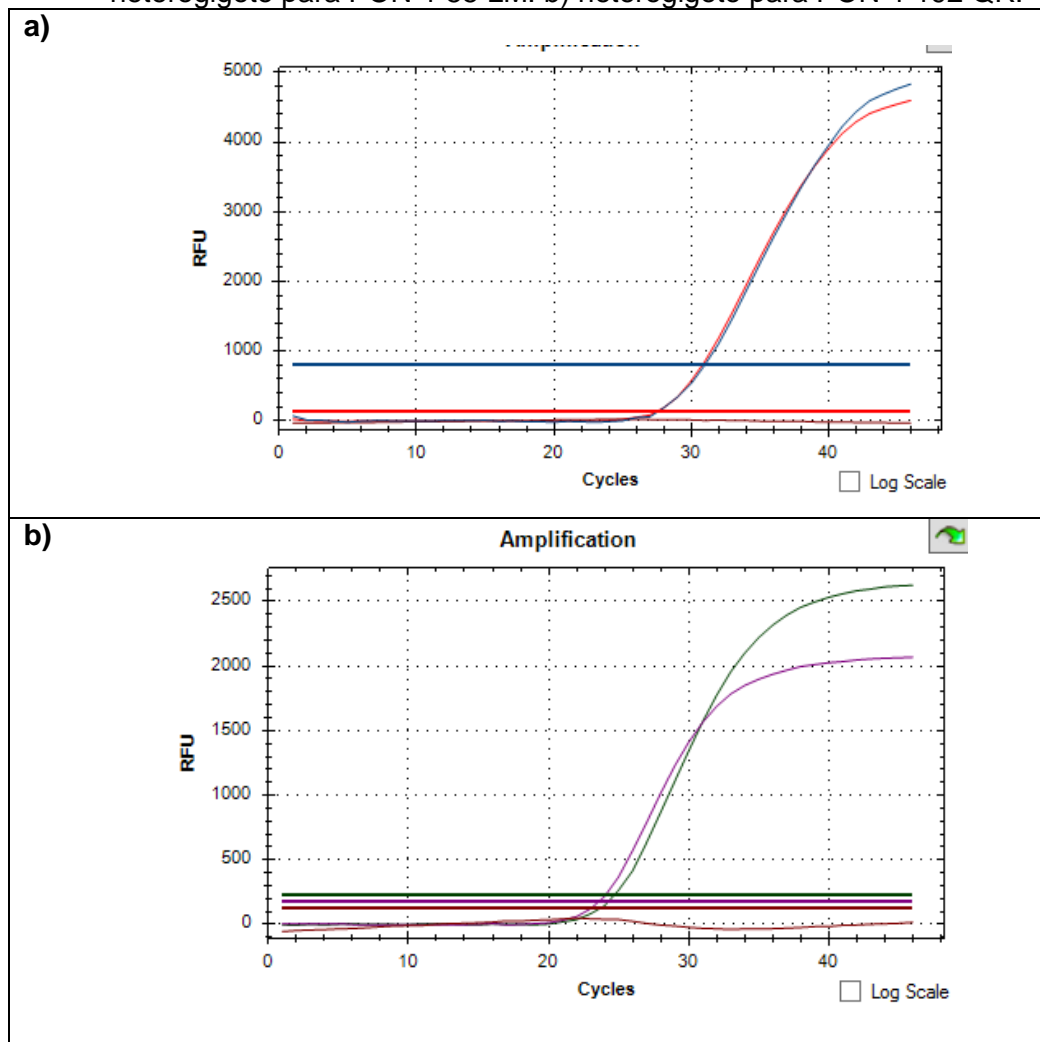
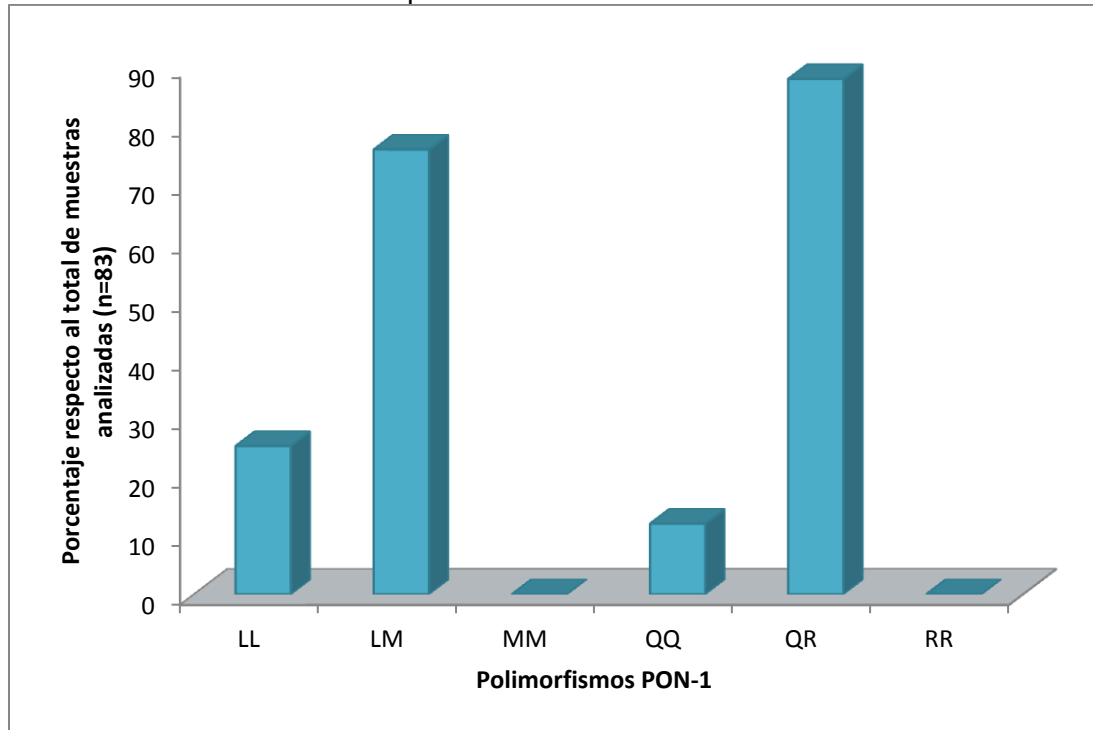


Figura 5-17. Distribución de los polimorfismos de la PON1 en las posiciones 55 (LL, LM y MM) y 192 (QQ, QR y RR) en muestras de voluntarios expuestos y controles de la población Colombiana.



Fuente: Resultados de la investigación

Después del conteo directo de los genotipos presentes en la población se calcularon las respectivas frecuencias genotípicas, los valores obtenidos, fueron usados para estimar las frecuencias alélicas. En la tabla 5-15 se muestran los resultados.

Tabla 5-15. Frecuencias Genotípicas y Alélicas estimadas para los polimorfismos 55 y 192 del Gen PON-1

| Posición | Frecuencia genotípica | | Frecuencia alélica | |
|----------|-----------------------|------------|--------------------|------------|
| | Genotipo | Frecuencia | Alélica | Frecuencia |
| PON1 55 | LL | 0,253 | L | 0,6265 |
| | LM | 0,747 | M | 0,3735 |
| | MM | 0,00 | | |
| PON1 192 | QQ | 0,121 | Q | 0,5605 |
| | QR | 0,879 | R | 0,4395 |
| | RR | 0,000 | | |

Fuente: Resultados de la investigación

5.5 Secuenciación

Las genotipificaciones de la PON-1 para los polimorfismos en las posiciones 55 y 192 se confirmaron secuenciando el 6% de las muestras escogidas al azar. Las muestras secuenciadas coincidieron en un 100% con las genotipificaciones.

5.6 Asociación entre los polimorfismos de la paraoxonasa (PON-1) y la actividad enzimática

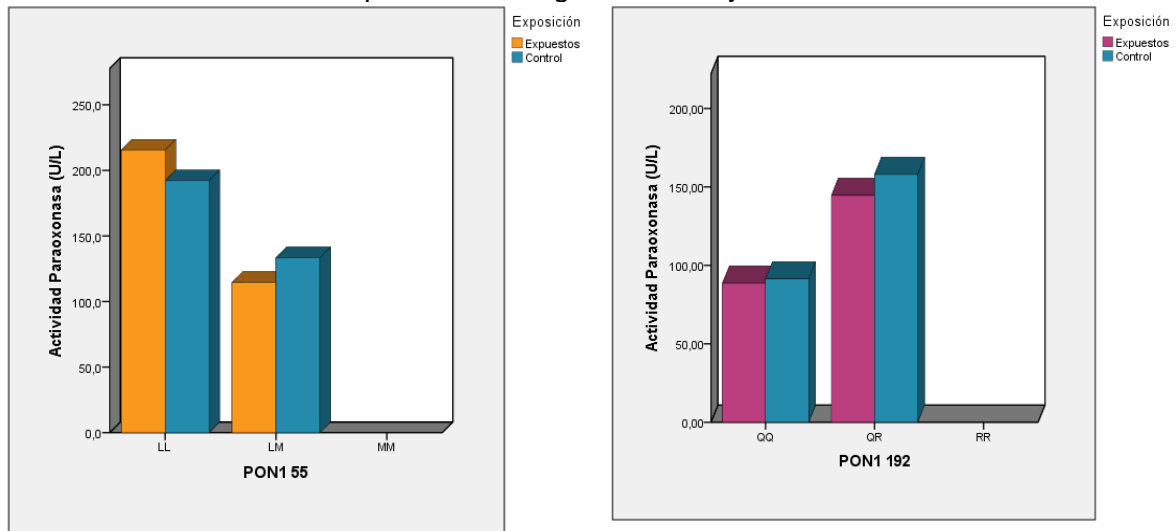
En la figura 5-18 y la tabla 5-16 se presentan los valores de actividad paraoxonasa en expuestos y controles de acuerdo con los polimorfismos genéticos 55 y 192. Al evaluar los datos de los genotipos entre expuestos y controles no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

El genotipo silvestre (LL) de PON-1 55 mostro los valores más altos de actividad enzimática ($215,5 \pm 121,4$ y $192,2 \pm 75,2$, para expuestos y controles respectivamente) con relación al genotipo PON-1 55 LM, de la misma manera y el genotipo QR de PON-1 192, mostro los valores más altos de actividad enzimática ($144,5 \pm 94,5$ y $157,8 \pm 88,7$, para expuestos y controles respectivamente), encontrándose una significancia estadística para dicha variación en todos los genotipos a excepción del grupo de expuestos para los polimorfismos de PON-1 192.

Tabla 5-16. Actividad paraoxonasa por cada genotipo de PON-1

| Genotipo | Expuestos | | | Controles | | | p-valor |
|------------------|------------------------|---------------|-----------------|------------------------|---------------|-----------------|---------------|
| | Actividad PONasa (U/L) | n | Rango | Actividad PONasa (U/L) | n | Rango | |
| PON-1 55 | | | | | | | |
| LL | $215,5 \pm 121,4$ | 10 | (50,2 - 424,6) | $192,2 \pm 75,2$ | 11 | (68,5 - 296,8) | 0,5452 |
| LM | $114,6 \pm 70,8$ | 33 | (27,4 - 273,9) | $133,4 \pm 95,1$ | 29 | (31,96 - 379,0) | 0,5582 |
| MM | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| p-valor | | 0,0162 | | | 0,0210 | | - |
| PON-1 192 | | | | | | | |
| QQ | $88,6 \pm 82,1$ | 8 | (31,9 - 232,9) | $91,32 \pm 112,5$ | 5 | (31,9 - 292,2) | 0,7302 |
| QR | $144,5 \pm 94,5$ | 35 | (27,39 - 424,6) | $157,8 \pm 88,7$ | 35 | (36,5 - 379,0) | 0,4019 |
| RR | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | - |
| p-valor | | 0,1352 | | | 0,0390 | | - |

*: Promedio (\bar{x}) \pm SD; **: U Mann-Whitney. La diferente letra suscrita revela diferencia significativa ($p < 0,05$).

Figura 5-18. Actividad paraoxonasa en expuestos y controles de acuerdo con los polimorfismos genéticos 55 y 192.

Fuente: Resultados de la investigación

Adicionalmente como se observa en la tabla 5-17 se listaron los valores de actividad enzimática y los genotipos de PON-1 en aquellos individuos que manifestaron episodios previos de intoxicación, encontrando que en dos individuos del grupo expuesto presentaban simultáneamente los genotipos que más afectan la actividad enzimática (PON-1 LM y QQ), situación que también se evidenció en el individuo control que manifestó intoxicación previa.

Tabla 5-17. Actividad paraoxonasa y polimorfismos en individuos con intoxicaciones previas

| Grupo | Actividad Paraoxonasa (U/L) | PON-1 55 | PON-1 192 |
|-----------|-----------------------------|-----------|-----------|
| Expuestos | 146,11 | LM | QR |
| | 155,24 | LM | QR |
| | 168,93 | LL | QR |
| | 251,12 | LM | QR |
| | 54,79 | LM | QR |
| | 73,05 | LL | QR |
| | 109,58 | LM | QR |
| | 73,05 | LL | QR |
| | 118,71 | LM | QR |
| | 178,07 | LM | QR |
| | 232,85 | LM | QR |
| | 301,34 | LL | QR |
| | 159,8 | LM | QQ |
| | 27,39 | LM | QQ |
| Control | 36,52 | LM | QQ |

Fuente: Resultados de la investigación

6. Discusión

La paraoxonasa es una enzima de amplio interés en el campo de toxicología, porque participa en el metabolismo de algunos compuestos organofosforados, por lo cual se esperaría que los individuos con baja actividad sérica de esta enzima tendrán menor capacidad para metabolizar los compuestos organofosforados. El conocimiento de este mecanismo es de importancia para la toxicología ocupacional puesto que los trabajadores expuestos a organofosforados están en riesgo de intoxicación aguda y crónica.

6.1 Perfil de la muestra

En este trabajo se estudiaron los niveles de actividad enzimática y 2 polimorfismos comunes de la paraoxonasa-1 en las posiciones 55 y 192, en 43 individuos expuestos ocupacionalmente a organofosforados que trabajan en una empresa productora de plaguicidas (edad: $35,4 \pm 9,49$) y 40 controles no expuestos ($32,28 \pm 8,65$) que actuaron como grupo control.

6.2 Actividad paraoxonasa

El valor promedio de actividad paraoxonasa que presentaron los 43 sujetos expuestos laboralmente a organofosforados fue de 138,04 U/L, siendo el mismo ligeramente inferior al del grupo control 149,52 U/L, pero sin encontrarse diferencia significativa entre los dos grupos, estos hallazgos podrían corresponder a los estándares en las prácticas de higiene ocupacional del grupo de expuesto puesto como medida ordinaria en la empresa productora de agroquímicos y plaguicidas donde laboran, los trabajadores deben utilizar todos los elementos de protección personal, se deben retirar los overoles a la hora del almuerzo, así como lavarse las manos y ducharse al finalizar la jornada laboral.

Sin embargo los valores de actividad paraoxonasa en expuestos y controles o en los 83 individuos en conjunto fue de 143,46 U/L, siendo inferiores a los que se han reportado en otros estudios similares. Por ejemplo, en India, se reportaron valores promedios de 241,52 para controles y 179,19 en expuestos a organofosforados (Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011), En México se encontraron valores medios de actividad paraoxonasa en 480,1 U/L en trabajadores rurales expuestos a organofosforados (Pérez-Herrera et al.,

2008) en España se han reportado valores medios de 247,6 y 188,8 U/L, para controles y fumigadores respectivamente (A, Hernández et al., 2003) y en un periodo de mínima exposición valores de 262,9 para controles y 260,3 U/L expuestos (López, 2005).

Aunque los valores de actividad paraoxonasa varían de un estudio a otro, el hecho que los promedios reportados en el presente estudio fueran bajo tanto para expuestos como controles en primer lugar muestra que muy posiblemente la rigurosa aplicación de los esquemas de protección en la empresa productora de organofosforados, ha minimizado los riesgos ocupacionales haciendo que las muestras de los dos grupos sean indiferenciables. Igualmente, puede indicar que la exposición en la muestra estudiada intervino otros factores como puede ser la exposición ambiental, principalmente la debida a contaminación de alimentos con organofosforados como ha sido reportado diversas investigaciones realizadas en Colombia (Castro, Ramos, Estevez, & Rangel, 2004; Gutiérrez & Londoño, 2009). En un estudio realizado en Bucaramanga, Santander se encontraron residuos de más de dos plaguicidas organofosforados en alimentos como papa, cebolla, tomate, manzana, fresas y uvas y el profenofos estuvo por encima de su límite máximo permitido (Murcia & Stashenko, 2008).

La actividad paraoxonasa puede estar modulada por diversos factores, como la edad, el consumo de cigarrillo, alcohol, medicamentos, entre otros (Lucio G Costa, Giordano, & Furlong, 2011; Lucio G Costa, Vitalone, et al., 2005). En este sentido, en el presente estudio no se encontró relación entre la edad de los participantes y la actividad paraoxonasa. Los estudios que evalúan esta asociación son contradictorios, algunos establecen que la actividad paraoxonasa es bastante constante en el tiempo, una vez que alcanza valores de los adultos y otros por el contrario la actividad disminuye con la edad, puede estar relacionado con el desarrollo de condiciones de estrés oxidativo con el envejecimiento (Lucio G Costa, Vitalone, et al., 2005; Seres, Paragh, Deschene, Fulop, & Khalil, 2004).

El consumo de cigarrillo no se asoció con una disminución de la actividad enzimática contrario a lo establecido en otras investigaciones. Sin embargo los niveles más bajos de actividad enzimática se presentaron en los individuos que declararon ser consumidores de alcohol dentro del grupo de expuestos con respecto a los controles. Esta diferencia probablemente se deba a los niveles de alcohol que ingirieron en cada grupo (que no se evaluó en el presente estudio). De acuerdo a lo reportado para hombres y mujeres saludables de edad media, dosis moderadas de alcohol (vino y cerveza) 4 vasos (40 g/día) causan un incremento en la actividad y niveles de la paraoxonasa (van der Gaag et al., 1999), pero en caso de en alcohólicos crónicos la actividad enzimática se disminuye y se relaciona con el grado del daño hepático, probablemente como consecuencia de la inactivación por los peróxidos lipídicos y/o a HDL alteraciones estructurales existentes en la enfermedad hepática alcohólica (Marsillach et al., 2007)

La actividad paraoxonasa estuvo significativamente más alta en los individuos que declararon estar consumiendo medicamentos, con relación a los que no, en el grupo de

controles (220,9 y 131,7 U/L respectivamente). Este comportamiento está ampliamente explicado por varios autores que han establecido que diversos productos farmacéuticos modulan la actividad de la paraoxonasa, en particular aquellos compuestos relacionados con la disminución de lípidos tales como estatinas y fibratos, así como algunas otras drogas (Lucio G Costa et al., 2011). En este estudio, el grupo de expuestos a organofosforados no presentó esta marcada diferencia. En los 7 individuos que declararon consumir medicamentos en el momento de la toma de muestra la actividad enzimática promedio fue de 169,6 U/L y los que no consumían medicamentos fue de 131,9 U/L. La divergencia de resultados entre controles y expuestos indica que al estar presente en los participantes varios de los factores que modulan la actividad paraoxonasa, algunos afectan más la respuesta que otros, en este caso se puede relacionar con el consumo de alcohol que estuvo más disminuido en los expuestos.

En el grupo de trabajadores evaluados también se presentó una tendencia a la disminución de la actividad al aumentar los años ejerciendo la labor (años de exposición), la cual también puede deberse al estrés oxidativo que se da con los años (Lucio G Costa, Vitalone, et al., 2005; Seres et al., 2004), pero también debe considerarse la posibilidad que la exposición continua a los organofosforados origine una disminución paulatina de la actividad de la enzima.

6.3 Polimorfismos de la paraoxonasa-1 PON-1

En los seres humanos la paraoxonasa-1, PON1 exhibe polimorfismos genéticos, tanto en la región codificante como en la promotora, que producen un cambio en la actividad y los niveles séricos de la enzima (Adkins, Gan, Mody, & La Du, 1993; Brophy et al., 2001), constituyéndose la determinación de estos polimorfismos en un importante bioindicador de susceptibilidad a organofosforados.

Diversos estudios describen una amplia variación en la distribución mundial de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos PON-1 55L/M. En el presente estudio el genotipo heterocigoto LM para PON-1 55 fue el que se encontró con mayor frecuencia (0,747), seguido del genotipo salvaje LL con una frecuencia de 0,253, no se evidencio la presencia del genotipo MM. Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado para otros grupos étnicos, se encontró una similitud con la frecuencia alélica descrita para españoles (Ferré et al., 2002; A F Hernández et al., 2003). Para este grupo, al igual que para las muestras analizadas en este trabajo, el alelo PON 55 M es el menos frecuente. Sin embargo, contrario al presente estudio en las poblaciones españolas descritas si se encontró presencia del genotipo MM, el cual tampoco estuvo presente en estudios realizados en asiáticos (Shin, Oh, Kim, & Kim, 2008; Zhang et al., 2006) En la tabla 5-1 se registran y comparan las frecuencias estimadas para asiáticos, europeos y latinos. Cabe notar que para este último grupo solo se encontraron reportes provenientes

de México. Con respecto a estudios en población colombiana, no se encuentran registros de estudios previos que evaluaran el polimorfismo PON-155 L/M, las frecuencias presentadas en la tabla 6-1 son el primer reporte para este alelo en población Colombiana. Los resultados obtenidos para el polimorfismo PON-1 55 L/M, pueden ser el resultado contribución de genes de diversos grupos étnicos, puesto que es conocido que en Colombia existe una diversidad étnica, pero es imposible hacer correlaciones de este tipo para la población muestreada dado que no se recolectaron tantos individuos que permitan explorar relaciones étnicas muy profundas.

Tabla 6-1. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas para PON-1 55 de diferentes grupos étnicos

| Continente | País | N | PON-1 55 | | | | | Fuente |
|---------------|----------|-----|-------------------------|-------|-------|----------------------|---------------|--|
| | | | Frecuencias genotípicas | | | Frecuencias alélicas | | |
| | | | LL | LM | MM | L | M | |
| Europa | España | 215 | 0,362 | 0,497 | 0,141 | 0,610 | 0,390 | (Ferré et al., 2002) |
| | España | ND | ND | ND | ND | 0,590 | 0,410 | (A F Hernández et al., 2003) |
| | España | 197 | 0,188 | 0,406 | 0,406 | 0,391 | 0,609 | (García-Martín et al., 2010) |
| | España | 155 | 0,294 | 0,578 | 0,127 | ND | ND | (Antonio F Hernández et al., 2013) |
| | Turquía | 108 | 0,500 | 0,380 | 0,120 | 0,690 | 0,310 | (Can Demirdöğen et al., 2008) |
| Asia | Korea | 592 | 0,899 | 0,101 | 0,00 | 0,957 | 0,043 | (Shin et al., 2008) |
| | China | 82 | 0,902 | 0,098 | 0,00 | 0,951 | 0,047 | (Zhang et al., 2006) |
| | India | 115 | 0,497 | 0,409 | 0,096 | 0,700 | 0,300 | (Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011) |
| Latinoamerica | México | 214 | 0,710 | 0,250 | 0,04 | 0,840 | 0,160 | (Rojas-García et al., 2005) |
| | México | 170 | 0,892 | 0,102 | 0,060 | 0,940 | 0,060 | (López-Flores et al., 2009) |
| | México | 431 | | | | 0,813 | 0,187 | (Huen, Harley, Bradman, Eskenazi, & Holland, 2010) |
| | México | 54 | 0,611 | 0,315 | 0,074 | 0,787 | 0,213 | (Huesca-Gómez, Soto, Castrejón-Téllez, Pérez-Méndez, & Gamboa, 2013) |
| | Colombia | 83 | 0,253 | 0,747 | 0,000 | 0,6265 | 0,3735 | Este estudio |

El polimorfismo en la posición 192 ha sido el más estudiado. En los individuos participantes en este estudio se encontró predominio del heterocigoto QR, sobre el homocigoto QQ, no encontrándose el heterocigoto salvaje RR. Al comparar los resultados obtenidos con lo reportado para otros grupos étnicos, se encontró una similitud con la frecuencia genotípica descrita para peruanos (Cataño Miraval, 2005), en los cuales también se presentó predominio de los heterocigotos PON-1 192 QR. Esta similitud de frecuencias alélicas puede deberse a que por la cercanía geográfica de los dos países se pudieron presentar los mismos procesos de mestizaje. La no existencia del genotipo RR también se reportó para una población de coreanos (Shin et al., 2008).

Al comparar la frecuencia alélica los resultados obtenidos fueron similares a los reportados para poblaciones asiáticas (hindúes y chinos) y latinas (mexicanos y peruanos) (Huen et al., 2010; Rojas-García et al., 2005; Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011; Zhang et al., 2006). En la tabla 6-2 se registran y comparan las frecuencias estimadas para asiáticos, europeos y latinos. De igual forma que para el polimorfismo PON-1 55 L/M, para el polimorfismo PON-1 192 Q/R, no se encontraron registros de estudios previos en población colombiana, los datos de nuestro son el primer reporte.

Tabla 6-2. Comparación de frecuencias genotípicas y alélicas para PON-1 192 diferentes grupos étnicos

| PON-1 192 | | | | | | | | |
|----------------------|-----------------|-----------|-------------------------|--------------|--------------|----------------------|--------------|---|
| Continente | País | N | Frecuencias genotípicas | | | Frecuencias alélicas | | Fuente |
| | | | QQ | QR | RR | Q | R | |
| Europa | España | 215 | 0,488 | 0,404 | 0,108 | 0,690 | 0,310 | (Ferré et al., 2002) |
| | España | ND | ND | ND | ND | 0,700 | 0,300 | (A F Hernández et al., 2003) |
| | España | 197 | 0,523 | 0,396 | 0,081 | 0,721 | 0,279 | (García-Martín et al., 2010) |
| | España | 155 | 0,500 | 0,422 | 0,078 | ND | ND | (Antonio F Hernández et al., 2013) |
| | Turquía | 108 | 0,444 | 0,389 | 0,167 | 0,639 | 0,361 | (Can Demirdöğen et al., 2008) |
| | Ucrania | 108 | 0,427 | 0,491 | 0,082 | 0,670 | 0,330 | (Pochernyaev, Tyzhnenko, Gorshunska, Poltorak, & Atramentova, 2009) |
| Asia | Irán | 85 | 0,568 | 0,383 | 0,049 | 0,820 | 0,180 | (Mahrooz et al., 2012) |
| | Korea | 592 | 0,438 | 0,563 | 0,00 | 0,719 | 0,281 | (Shin et al., 2008) |
| | China | 82 | 0,183 | 0,561 | 0,256 | 0,463 | 0,537 | (Zhang et al., 2006) |
| | India | 115 | 0,322 | 0,513 | 0,148 | 0,590 | 0,410 | (Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011) |
| Latinoamerica | México | 214 | 0,290 | 0,440 | 0,270 | 0,510 | 0,490 | (Rojas-García et al., 2005) |
| | México | 155 | 0,264 | 0,574 | 0,161 | 0,551 | 0,448 | (Gamboa et al., 2008) |
| | México | 54 | 0,210 | 0,510 | 0,280 | ND | ND | (Pérez-Herrera et al., 2008) |
| | México | 170 | 0,161 | 0,470 | 0,369 | 0,400 | 0,600 | (López-Flores et al., 2009) |
| | México | 431 | ND | ND | ND | 0,511 | 0,489 | (Huen et al., 2010) |
| | México | 54 | 0,259 | 0,500 | 0,241 | 0,490 | 0,510 | (Huesca-Gómez et al., 2013) |
| | Perú | 89 | 0,236 | 0,607 | 0,157 | 0,539 | 0,461 | (H. C. Cataño et al., 2006) |
| | Colombia | 83 | 0,121 | 0,879 | 0,000 | 0,561 | 0,439 | Este estudio |

6.4 Influencia de los polimorfismos sobre la actividad paraoxonasa

Los polimorfismos de la región codificante de la paraoxonasa-1 han sido investigados por sus efectos sobre las eficiencias catalíticas de hidrólisis de sustratos específicos. Se han realizado numerosos estudios en diferentes poblaciones étnicas para evaluar la correlación entre la actividad paraoxonasa y su prevalencia del genotipo en los voluntarios sanos, así como en los trabajadores expuestos a organofosforados y en enfermedades asociadas al polimorfismo (H. C. Cataño et al., 2006; Gamboa et al., 2008; García-Martín et al., 2010; Guxens et al., 2008; Huesca-Gómez et al., 2013; Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011).

La sustitución PON-1 192 Q/R afecta significativamente la eficiencia catalítica de la paraoxonasa demostrando ser responsable de las variaciones de la actividad dependiente de sustrato. En el presente estudio, se observó un aumento de la actividad PON-1 en QR, seguido de QQ en ambos grupos de estudio. Esto es consistente con los hallazgos previos establecen la actividad contienen alelo R (A F Hernández et al., 2003; Pérez-Herrera et al., 2008; Singh, Kumar, Thakur, et al., 2011; Sirivarasai et al., 2007)

El polimorfismo L/M en la posición 55 no afecta a la actividad catalítica, pero se ha asociado con la variabilidad de los niveles plasmáticos, lo que conlleva a que los individuos con el alelo PON-1 55 M, presenten una menor actividad PON-1 inferior (L. Costa et al., 2003). En este estudio de igual forma que en otros reportes (Can Demirdöğen et al., 2008; Antonio F Hernández et al., 2013; Sirivarasai et al., 2007), se encontraron valores de actividad paraoxonasa mayores para los individuos que presentaban el genotipo LL en relación a los heterocigotos LM.

7. Conclusiones y Recomendaciones

7.1 Conclusiones

1. Se realizó la caracterización de la actividad enzimática y polimorfismos genéticos de la paraoxonasa-1 en personas expuestas ocupacionalmente a plaguicidas organofosforados en el municipio de Soacha Cundinamarca.
2. El comportamiento de la actividad enzimática fue ligeramente menor para los individuos expuestos a organofosforados con relación a los controles (no estadísticamente significativo). No se encontró relación entre la edad, el índice de masa corporal con la actividad paraoxonasa en ninguno de los 2 grupos estudiados, sin embargo en los individuos expuestos se encontró una correlación entre el consumo de alcohol y los niveles más bajos de actividad y en los controles se relacionó el consumo de medicamentos con los valores altos de actividad paraoxonasa.
3. En los individuos expuestos el valor de la actividad enzimática presentó una tendencia a la disminución al aumentar los años de exposición.
4. La población estudiada tiene frecuencia elevada de heterocigotos para los polimorfismos 55 y 192 (0,747 y 0,879 respectivamente), no encontrándose los homocigotos mutados en ninguna de las dos posiciones. No se encontraron diferencias para cada genotipo entre los individuos expuestos y control.
5. La actividad paraoxonasa fue mayor en los individuos con el genotipo PON 55 LL y PON 192 QR, tanto en expuestos como en controles, y menor para los genotipos LM y QQ.

7.2 Recomendaciones

1. Se recomienda realizar otros estudios con el fin de evaluar la asociación de los polimorfismos de la PON-1 55L/M y 192Q/R y la actividad paraoxonasa con el fin de contar con más datos que permitan determinar si se puede considerar la paraoxonasa-1 un bioindicador adecuado de susceptibilidad en aquellos lugares en donde se presente exposición ocupacional a organofosforados como paration, clorpirifos, diazinon.
2. Se deberían realizar otros tipos de estudios en los cuales se incluya: una muestra de tipo poblacional, otro tipo de individuos expuestos como trabajadores de cultivos de flores y tomate entre otros.
3. En estudios futuros para la determinación de la actividad enzimática se pueden utilizar otros sustratos para complementar los resultados que se obtengan con el paraoxon, con el fin de inferir claramente genotipos y fenotipos de la paraoxonasa 1.

8. Bibliografía

- Adkins, S., Gan, K. N., Mody, M., & La Du, B. N. (1993). Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *American Journal of Human Genetics*, 52(3), 598–608. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682165&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Akgür, S. ., Öztürk, P., Solak, I., Moral, A. ., & Ege, B. (2003). Human serum paraoxonase (PON1) activity in acute organophosphorous insecticide poisoning. *Forensic Science International*, 133(1-2), 136–140. [http://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00060-4](http://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00060-4)
- Androutsopoulos, V. P., Kanavouras, K., & Tsatsakis, A. M. (2011). Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: implications in neurodegenerative diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256(3), 418–24. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2011.08.009>
- Brophy, V. H., Jampsa, R. L., Clendenning, J. B., McKinstry, L. A., Jarvik, G. P., & Furlong, C. E. (2001). Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1428–1436. <http://doi.org/10.1086/320600>
- Buratti, F. M., Leoni, C., & Testai, E. (2007). The Human Metabolism of Organophosphorothionate Pesticides: Consequences for Toxicological Risk Assessment. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*, 2(1), 37–44. <http://doi.org/10.1007/s00003-006-0109-z>
- Can Demirdögen, B., Türkanoglu, A., Bek, S., Sanisoğlu, Y., Demirkaya, S., Vural, O., ... Adali, O. (2008). Paraoxonase/arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clinical Biochemistry*, 41(1-2), 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.08.010>
- Canales, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2003). Paraoxonasa, ¿algo más que una enzima? *Medicina Clínica*, 121(14), 537–548. <http://doi.org/10.1157/13053392>
- Castro, P. A., Ramos, J. P., Estevez, S., & Rangel, A. (2004). Residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de tomate. *Revista de Ingeniería*, 20, 14–22.

- Cataño, H. C., Cueva, J. L., Cardenas, A. M., Izaguirre, V., Zavaleta, A. I., Carranza, E., & Hernandez, A. F. (2006). Distribution of Paraoxonase-1 Gene Polymorphisms and Enzyme Activity in a Peruvian Population. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47, 699–706. <http://doi.org/10.1002/em>
- Cataño, H., Cardenas, A., Cueva, J., Amparo, Z., Izaguirre, V., & Carranza, E. (2005). Actividad y fenotipos de paraoxonasa-1 en una población de estudiantes universitarios de Lima-Perú. *Ciencia E Investigacion VIII*.
- Cataño Miraval, H. C. (2005). *Perfil de distribución de los genotipos y fenotipos de Paraoxonasa-1 (PON-1) en 89 estudiantes de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Costa, L. G. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 366(1-2), 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2005.10.008>
- Costa, L. G., Cole, T. B., Vitalone, A., & Furlong, C. E. (2005). Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 352(1-2), 37–47. <http://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.09.019>
- Costa, L. G., Giordano, G., Cole, T. B., Marsillach, J., & Furlong, C. E. (2013). Paraoxonase 1 (PON1) as a genetic determinant of susceptibility to organophosphate toxicity. *Toxicology*, 307, 115–22. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2012.07.011>
- Costa, L. G., Giordano, G., & Furlong, C. E. (2011). Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: the hunt goes on. *Biochemical Pharmacology*, 81(3), 337–44. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.11.008>
- Costa, L. G., Li, W. F., Richter, R. J., Shih, D. M., Lusi, A., & Furlong, C. E. (1999). The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chemico-Biological Interactions*, 119-120, 429–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421480>
- Costa, L. G., Vitalone, A., Cole, T. B., & Furlong, C. E. (2005). Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology*, 69(4), 541–50. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.08.027>
- Costa, L., Rebecca, R., Li, W.-F., Cole, T., Guizzetti, M., & Furlong, C. (2003). Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomarkers*, 8(1), 1–12.
- Draganov, D. I., & La Du, B. N. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(1), 78–88. <http://doi.org/10.1007/s00210-003-0833-1>

- Eawag-bbd. (2005). From Paraoxon to p-Nitrophenol and Diethylphosphoric acid. Retrieved from <http://eawag-bbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=r&reacID=r0067>
- Fenik, J., Tankiewicz, M., & Biziuk, M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), 814–826. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.008>
- Fernández, D., Mancipe, L., & Fernández, D. (2010). Intoxicación Por Organofosforados. *Revista Med*, 18(1), 84–92.
- Ferré, N., Tous, M., Paul, A., Zamora, A., Vendrell, J. 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12074827>
- Fridman, O., Fuchs, A. G., Porcile, R., Morales, A. V., & Gariglio, L. O. (2011). Paraoxonasa: sus múltiples funciones y regulación farmacológica. *Archivos de Cardiología de México*, 81(3), 251–260.
- Gamboa, R., Regalado, J. C., Huesca-gómez, C., Posadas-Romero, C., Paris, J. V., Vargas-alarcón, G., & Pérez-méndez, Ó. (2008). Actividades paraoxonasa y arilesterasa bajas en sujetos mexicanos con enfermedad arterial coronaria. *Archivos de Cardiología de México*, 78, 360–368.
- García-Martín, E., Martínez, C., Serrador, M., Alonso-Navarro, H., Navacerrada, F., Agúndez, J. a G., & Jiménez-Jiménez, F. J. (2010). Paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms and risk for migraine. *Journal of Neurology*, 257(9), 1482–5. <http://doi.org/10.1007/s00415-010-5551-2>
- Gupta, N., Gill, K., & Singh, S. (2009). Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *The Indian Journal of Medical Research*, 130(4), 361–368. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942738>
- Gutiérrez, J., & Londoño, A. (2009). Determinación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en tomates de mercados de cadena en las ciudades de Pereira y Armenia, Colombia. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 8(3), 165–171.
- Gutierrez, M., Valenzuela, A., Aldana, M., Grajeda, P., Cabrera, R., Ballesteros, M., ... Fierro, D. (2012). Colinesterasa y paraoxonasa séricas como biomarcadores de exposición a plaguicidas en jornaleros agrícolas. *Revista de Ciencias Biológicas Y Salud*, 2, 40–46.
- Guxens, M., Tomás, M., Elosua, R., Aldasoro, E., Segura, A., Fiol, M., ... Marrugat, J. (2008). Association between paraoxonase-1 and paraoxonase-2 polymorphisms and the risk of acute myocardial infarction. *Revista Española de Cardiología*, 61(3), 269–275. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18361900>

- Hartl, D. L. (2000). *A Primer of Population Genetics. Sunderland, Massachusetts. U.S.A: Sinauer Associates, Incorporated, 26–31.*
- Hernández, A. F., Gil, F., Lacasaña, M., Rodríguez-Barranco, M., Gómez-Martin, A., Lozano, D., & Pla, A. (2013). Modulation of the endogenous antioxidants paraoxonase-1 and urate by pesticide exposure and genetic variants of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 61*, 164–70. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.039>
- Hernández, A. F., Gonzalvo, M. C., Gil, F., Rodrigo, L., Villanueva, E., & Pla, A. (1999). Distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in a Spanish population. *Chemico-Biological Interactions, 119-120*, 201–209. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421454>
- Hernández, A. F., Mackness, B., Rodrigo, L., López, O., Pla, A., Gil, F., ... Mackness, M. I. (2003). Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure. *Human & Experimental Toxicology, 22(11)*, 565–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14686479>
- Hernández, A. F., Pla, A., Gómez, M. A., Pena, G., Gil, F., & Rodrigo, G. P. L. (1998). Susceptibilidad a los insecticidas organofosforados en trabajadores de invernadero: importancia de los marcadores bioquímicos. Retrieved from <http://www.ugr.es/~ajerez/publicaciones/5.pdf>
- Hernández, A., López, O., Gil, F., & Rodrigo, L. (2007). Biomonitorización de trabajadores con exposición crónica a plaguicidas. Importancia de las esterasas sanguíneas. *La Mutua*.
- Hernández Plazas, D., & Olarte, M. F. (2011). Intoxicación por inhibidores de la colinesterasa (organofosforados y carbamatos) en niños y adolescentes: revisión de la literatura y guía de manejo. *Acta Colombiana de Cuidado Intensivo, 11(1)*, 26–33.
- Huen, K., Harley, K., Bradman, A., Eskenazi, B., & Holland, N. (2010). Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican-American mothers and children with different genotypes and haplotypes. *Toxicology and Applied Pharmacology, 244(2)*, 181–189. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2009.12.031>
- Huesca-Gómez, C., Soto, M. E., Castrejón-Téllez, V., Pérez-Méndez, O., & Gamboa, R. (2013). PON1 gene polymorphisms and plasma PON1 activities in Takayasu's arteritis disease. *Immunology Letters, 152(1)*, 77–82. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.04.005>
- Hurtado Clavijo, C. M., & Gutierrez de Salazar, M. (2005). Enfoque del paciente con intoxicación aguda por plaguicidas organofosforados. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb, 53(2)*, 244–258.
- Jeyaratnam, J. (1990). Acute pesticide poisoning: A mayor global health problem. *World Health Statistics Quarterly, 43(3)*, 139–144.

- Karalliedde, L. D., Edwards, P., & Marrs, T. C. (2003). Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 1–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12453722>
- Kesavachandran, C. N., Fareed, M., Pathak, M. K., Bihari, V., Mathur, N., & Srivastava, A. K. (2009). Adverse health effects of pesticides in agrarian populations of developing countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 200(80), 33–52. <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-0028-9>
- Lacasaña, M., López-Flores, I., Rodríguez-Barranco, M., Aguilar-Garduño, C., Blanco-Muñoz, J., Pérez-Méndez, O., ... Cebrian, M. E. (2010). Interaction between organophosphate pesticide exposure and PON1 activity on thyroid function. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 249(1), 16–24. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2010.07.024>
- Lee, S., Poet, T. S., Smith, J. N., Busby-Hjerpe, A. L., & Timchalk, C. (2010). Effect of in vivo nicotine exposure on chlorpyrifos pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 184(3), 449–457. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.024>
- López, O. (2005). *Influencia de la exposición crónica a plaguicidas sobre diversos marcadores bioquímicos (esterasas y enzimas antioxidantes) en trabajadores de invernadero de la costa oriental de andalucía - Tesis Doctoral*. Universidad De Granada. Retrieved from <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/554/1/15376904.pdf>
- López-Flores, I., Lacasaña, M., Blanco-Muñoz, J., Aguilar-Garduño, C., Sanchez-Villegas, P., Pérez-Méndez, O. a, & Gamboa-Avila, R. (2009). Relationship between human paraoxonase-1 activity and PON1 polymorphisms in Mexican workers exposed to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters*, 188(2), 84–90. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.010>
- Lukaszewicz-Hussain, A. (2010). Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(2), 145–150. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.006>
- Mackness, B., Durrington, P. N., & Mackness, M. I. (1998). Human serum paraoxonase. *General Pharmacology*, 31(3), 329–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141395>
- Mahrooz, A., Gohari, G., Hashemi, M.-B., Zargari, M., Musavi, H., Abedini, M., & Alizadeh, A. (2012). R-carrying genotypes of serum paraoxonase (PON1) 192 polymorphism and higher activity ratio are related to susceptibility against ischemic stroke. *Molecular Biology Reports*, 39(12), 11177–11185. <http://doi.org/10.1007/s11033-012-2027-8>
- Marsillach, J., Ferré, N., Vila, M. C., Lligoña, A., Mackness, B., Mackness, M., ... Camps, J. (2007). Serum paraoxonase-1 in chronic alcoholics: relationship with liver disease. *Clinical Biochemistry*, 40(9-10), 645–50. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.01.020>

- Masson, P., Rochu, D., & Chabrie, E. (2010). *The HDL Handbook* (pp. 99–131). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-382171-3.10006-3>
- Matthews, A. R., Sutter, M. E., & Rentz, D. E. (2011). Serum paraoxonase-1 (PON-1) genotype and exposure to organophosphorous insecticides--is there a high-risk population? *Journal of Medical Toxicology*, 7(3), 243–247. <http://doi.org/10.1007/s13181-011-0166-2>
- Min, J., Park, H., Park, B., Kim, Y. J., Park, J., Lee, H., ... Hong, Y. C. (2006). Paraoxonase gene polymorphism and vitamin levels during pregnancy: Relationship with maternal oxidative stress and neonatal birthweights. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N. Y.)*, 22(3), 418–424. <http://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.01.003>
- Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, C. (2008). *Inventario de Plaguicidas*. Retrieved from http://siscop.ine.gob.mx/descargas/pnis/colombia_plaguicidas_cop.pdf
- Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial, C., Augusto, C., & Gómez, B. (2007). *Uso aparente de plaguicidas en Colombia durante los años 2004-2007* (pp. 1–28).
- Ministerio de protección social, R. de colombia. (2007). *Guía de atención integral en salud ocupacional basada en la evidencia para trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa (organofosforados y carbamatos): (Gatiso- PIC)* (pp. 1–143). Retrieved from http://www.epssura.com/guias/guia_gatiso_exposicion_organofosforado.pdf
- Morantes Medina, S. J. (2014). *Análisis genético y funcional de polimorfismos de CYP2C8 en muestras de población colombiana: Implicaciones en la respuesta a paclitaxel en cáncer de pulmón*. Universidad Nacional de Colombia.
- Moreno-Banda, G., Blanco-Muñoz, J., Lacasaña, M., Rothenberg, S. J., Aguilar-Garduño, C., Gamboa, R., & Pérez-Méndez, O. (2009). Maternal exposure to floricultural work during pregnancy, PON1 Q192R polymorphisms and the risk of low birth weight. *The Science of the Total Environment*, 407(21), 5478–5485. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.033>
- Murcia, A., & Stashenko, E. (2008). Determinación de plaguicidas organofosforados en vegetales producidos en Colombia. *Agro Sur*, 36(2), 71–81.
- Nus, M., Sánchez-Muniz, F., & Sánchez-montero, J. M. (2008). Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte I. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 74, 5–27.
- Pasdar, A., Ross-Adams, H., Cumming, A., Cheung, J., Whalley, L., St Clair, D., & MacLeod, M.-J. (2006). Paraoxonase gene polymorphisms and haplotype analysis in a stroke population. *BMC Medical Genetics*, 7, 28–33. <http://doi.org/10.1186/1471-2350-7-28>

- Pediatric Environmental Health Specialty Unit (PEHSU). (2007). *Organophosphate pesticides and child health*. University of Washington. Retrieved from <http://depts.washington.edu/opchild/acute.html>
- Pérez, I. A. G., Santana, S. P., Argudin, T. D., & Gardon, D. O. P. (2007). Analysis of blood processing conditions to obtain high-quality total RNA from human leukocyte concentrate. *Genetics and Molecular*, 6(1), 298–307.
- Pérez Parra, S. (2009). *Influència de paraoxonasa-1 (PON1) en l'evolució de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana-1 i les seves complicacions metabòliques*. Tesis Doctoral. Universitat Rovira I Virgili.
- Pérez-Herrera, N., Polanco-Minaya, H., Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M. J., Hernández-Ochoa, I., Rojas-García, E., ... Quintanilla-Vega, B. (2008). PON1Q192R genetic polymorphism modifies organophosphorous pesticide effects on semen quality and DNA integrity in agricultural workers from southern Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230(2), 261–268. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2008.02.021>
- Pochernyaev, A. K., Tyzhnenko, T. V., Gorshunskaya, M. Y., Poltorak, V. V., & Atramentova, L. A. (2009). Polymorphism of the paraoxonase (PON-1) gene in the Slavonic part of the Kharkiv population. *Cytology and Genetics*, 43(5), 348–351. <http://doi.org/10.3103/S0095452709050090>
- Povey, A. C. (2010). Gene-environmental interactions and organophosphate toxicity. *Toxicology*, 278(3), 294–304. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2010.02.007>
- Rojas-García, A. E., Solís-Heredia, M. J., Piña-Guzmán, B., Vega, L., López-Carrillo, L., & Quintanilla-Vega, B. (2005). Genetic polymorphisms and activity of PON1 in a Mexican population. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 205(3), 282–289. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2004.10.015>
- Seres, I., Paragh, G., Deschene, E., Fulop, T., & Khalil, A. (2004). Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Experimental Gerontology*, 39(1), 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2003.08.001>
- Shadnia, S., Azizi, E., Hosseini, R., Khoei, S., Fouladdel, S., Pajoumand, A., ... Abdollahi, M. (2005). Evaluation of oxidative stress and genotoxicity in organophosphorus insecticide formulators. *Human & Experimental Toxicology*, 24(9), 439–445. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16235732>
- 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. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00929.x>
- Simoniello, M. F., Kleinsorge, E. C., Scagnetti, J. A., Mastandrea, C., Grigolato, R. A., Paonessa, A. M., & Carballo, M. A. (2010). Biomarkers of cellular reaction to pesticide exposure in a rural population. *Biomarkers: Biochemical Indicators of*

- Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 15(1), 52–60. <http://doi.org/10.3109/13547500903276378>
- Singh, S., Kumar, V., Thakur, S., Banerjee, B. D., Rautela, R. S., Grover, S. S., ... Rai, A. (2011). Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 252(2), 130–7. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2011.01.014>
- Singh, S., Kumar, V., Vashisht, K., Singh, P., Banerjee, B. D., Rautela, R. S., ... Rai, A. (2011). Role of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP3A5, CYP2C9, CYP2D6, and PON1 in the modulation of DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 257(1), 84–92. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2011.08.021>
- Sirivarasai, J., Kaojarern, S., Yoovathaworn, K., & Sura, T. (2007). Paraoxonase (PON1) polymorphism and activity as the determinants of sensitivity to organophosphates in human subjects. *Chemico-Biological Interactions*, 168(3), 184–92. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.04.006>
- Terry, A. V. (2012). Functional consequences of repeated organophosphate exposure: potential non-cholinergic mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics*, 134(3), 355–65. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.03.001>
- Valiyaveetil, M., Alamneh, Y., Biggemann, L., Soojhawon, I., Farag, H. a, Agrawal, P., ... Nambiar, M. P. (2011). In vitro efficacy of paraoxonase 1 from multiple sources against various organophosphates. *Toxicology in Vitro*, 25(4), 905–913. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.02.012>
- Valiyaveetil, M., Alamneh, Y., Rezk, P., Biggemann, L., Perkins, M. W., Sciuto, A. M., ... Nambiar, M. P. (2011). Protective efficacy of catalytic bioscavenger, paraoxonase 1 against sarin and soman exposure in guinea pigs. *Biochemical Pharmacology*, 81(6), 800–809. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.12.024>
- Van der Gaag, M. S., van Tol, A., Scheek, L. M., James, R. W., Urgert, R., Schaafsma, G., & Hendriks, H. F. J. (1999). Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis*, 147(2), 405–410. [http://doi.org/10.1016/S0021-9150\(99\)00243-9](http://doi.org/10.1016/S0021-9150(99)00243-9)
- 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. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 365(1-2), 98–103. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2005.07.034>

9. Anexos

Anexo 1: Consentimiento informado



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LA PARAOXONASA-1 (PON1) Y BUTIRILCOLINESTERASA (BCHE) EN TRABAJADORES OCUPACIONALMENTE EXPUESTOS A PLAGUICIDAS INHIBIDORES DE COLINESTERASA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Fecha: _____

Usted ha sido invitado a participar de un estudio que será ejecutado por los grupos de investigación de Toxicología Ambiental Y Ocupacional (TOXICAO) y el grupo de FARMACOGENETICA de la Universidad Nacional de Colombia, a través del cual se busca conocer y evaluar los efectos de los plaguicidas organofosforados sobre la actividad enzimática y polimorfismos genéticos de butirilcolinesterasa y paraoxonasa-1.

Si usted está de acuerdo en participar en el estudio, se le hará entrega de un cuestionario que deberá diligenciar de la manera más clara posible, completa y sincera, el cual nos aportará información de gran importancia para el desarrollo de este estudio y posteriormente se le pedirá donar dos muestra de sangre periférica (~10 mL), esta se tomará en la mañana después de un ayuno de doce horas. Estas muestras se utilizarán únicamente con propósitos netamente científicos durante esta investigación

Los procedimientos a realizar son seguros, no le ocasionarán ningún daño; la punción por la aguja puede causar alguna incomodidad, si llega a presentar alguna molestia será atendido de inmediato.

Usted en este estudio es de carácter investigativo, usted participará como voluntario y no recibirá ninguna retribución económica por su participación, podrá retirarse cuando así lo considere.

Se garantiza estricta confidencialidad con la información personal del participante y los datos obtenidos durante el desarrollo de la investigación.

Este estudio está regido por las normas de ética en investigación dictadas por el estado Colombiano en resolución 8430 de 1993.

Yo _____ identificado con documento de identidad _____ de _____ acepto participar en este estudio y hago constar que se me ha explicado claramente y entiendo el carácter del mismo, sus riesgos y beneficios, además acepto proporcionar información veraz y las muestras de sangre que sean requeridas. Para constancia firmo a continuación.

Firma del voluntario

Firma del testigo

Firma del investigador

Anexo 2: Encuesta características sociodemográficas, antecedentes clínicos, ocupacionales y estilo de vida

| Encuesta Trabajadores Ocupacionalmente Expuestos a Plaguicidas | | | |
|---|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Espacio diligenciado por el investigador | | | |
| Código: | _____ | Fecha encuesta: | _____ Empresa: _____ |
| Buenos días, le agradecemos por brindarnos unos minutos de su tiempo para responder las siguientes preguntas, por favor lea preguntas cuidadosamente y contéstelas tan claro y conciso como le sea posible brindando la información correcta. | | | |
| Las repuestas que usted nos proporcione serán utilizadas para la interpretación de nuestros resultados y no estarán asociadas con su nombre en ningún documento público y siendo conocidas únicamente por los investigadores de este estudio. | | | |
| 1. Datos Personales | | | |
| Nombre: | _____ | | |
| Sexo: | Masculino <input type="checkbox"/> | Femenino <input type="checkbox"/> | Edad: _____ |
| Fecha de nacimiento: | _____ | | |
| Lugar de nacimiento: | _____ | | |
| 2. Datos Socio Demográficos | | | |
| Escolaridad: | Primaria <input type="checkbox"/> | Secundaria <input type="checkbox"/> | Técnico <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> Cual: _____ |
| Estado civil: | Soltero <input type="checkbox"/> | Casado <input type="checkbox"/> | Unión Libre <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> Cual: _____ |
| Municipio donde reside: | _____ | | |
| Municipio donde trabaja: | _____ | | |
| Lugar donde Nació: | _____ | | |
| Madre: | _____ | Padre: | _____ |
| Abuela Materna: | _____ | Abuela Paterna: | _____ |
| Abuelo Materno: | _____ | Abuelo Paterno: | _____ |
| 3. Datos Clínicos | | | |
| Peso (Kg): | _____ | Estatura (m): | _____ IMC: _____ |
| Ha sufrido de alguna enfermedad: | Si <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> | ¿Cuál?: _____ |
| Le ha dicho algún médico que: | Tiene colesterol alto | Si <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| | Tiene triglicéridos altos | Si <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| | Tiene niveles elevados de azúcar | Si <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |
| | Tiene tensión alta | Si <input type="checkbox"/> | No <input type="checkbox"/> |

Sufre del corazón Si No

Tiene Hijos: Si No Número de hijos: _____

A presentado inconvenientes para tener hijos Si No Cual: _____

En caso de ser mujer responda lo siguiente:

A estado embarazada Si No Número de embarazos: _____

Ha presentado algún aborto: Si No Número de abortos: _____

Se encuentra embarazada actualmente: Si No

Ha presentado problemas durante el embarazo: Si No

Cual: _____

Consumo medicamentos en la actualidad: Si No Nombres: _____

Se ha sacado radiografías en el último año Si No

Ha presentado episodios de intoxicación Si No Cual: _____

Tiempo: _____ Gravedad: _____

4. Estilo de Vida

Cigarrillo Si: No: Hace cuanto fuma: _____ Número de cigarrillos por día: _____

Alcohol Si: No:

Tipo de bebida alcoholica: Cerveza Aguardiente Ron Guarapo Vino

Otro Cual: _____

Frecuencia: Diaria Semanal Quincenal Mensual Ocasional

5. Datos Ocupacionales

Afiliación al EPS Si: No: Cual: _____

Afiliación a ARL Si: No: Cual: _____

Ocupación: _____ Tiempo de ejercer esta labor: _____

Cite los organofosforados que maneja con mayor frecuencia:

Jornada diaria (horas): _____

Proceso en el que participa: Formulación Mezcla Empaque Otro _____ Cual _____

Que elementos de protección personal utiliza?

Guantes Si: No:
 Botas Si: No:
 Overol Si: No:
 Mascara Si: No:

Impermeable Si: No:

Tipo de mascara: Careta Media cara Cara completa 1 filtro 2 filtros

Se cambia de ropa al finalizar la jornada laboral Si: No:

Cuando lava su ropa de trabajo?

Después de fumigar Una vez por semana Dos veces por semana

Lava la ropa de trabajo en casa junto con la ropa de la familia Si: No:

Donde guarda la ropa de trabajo?

Dentro de la casa Área exclusiva Junto con otra ropa

Se lava las manos antes de ingerir los alimentos Si: No:

Se ducha el cuerpo al finalizar la jornada de trabajo Si: No:

Ha recibido capacitación sobre manejo seguro de plaguicidas?

Cuando fue la última capacitación Mes _____ Año _____

Anexo 3: Concepto aprobatorio Comité de ética de la Facultad De Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA

Bogotá D.C., 21 de agosto de 2012
MT-327-12

Estudiante
DIANA CECILIA MARQUEZ
Maestría en Toxicología
Facultad de Medicina

Apreciada Estudiante

Comedidamente me permito informarle que el Comité de Ética de la Facultad de Medicina en su reunión del día 09 de agosto de 2012 acta No 104, dio su concepto aprobatorio del proyecto de tesis titulado, "CARACTERIZACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA PARAOXONASA-1 (PON-1), EN UNA MUESTRA DE PERSONAS EXPUESTAS Y NO EXPUESTAS A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS, BOGOTÁ 2012".

Agradezco su atención a la presente

Se anexa copia de la comunicación CE-14

Cordialmente


JAIRO ALFONSO TELLEZ MOSQUERA
Profesor Titular
Coordinador Académico
Programa Curricular Maestría en Toxicología
Departamento de Toxicología

Elizabeth

Copia Profesor Fabio Ancizar Aristizabal- Director de Tesis

145 años
Innovando

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA piso 2ª Oficina 203
Teléfono(s): 3165153 directo Conmutador: 3165000 extensión 15120,15184, 15056
Correo electrónico: maetoxico_fm bog@unal.edu.co
Bogotá Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

CE – 14
ACTA DE EVALUACIÓN: N° 104
Fecha: 09 de agosto de 2012

Nombre completo del proyecto: "CARACTERIZACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA Y POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA PARAOXONASA-1 (PON-1), EN UNA MUESTRA DE PERSONAS EXPUESTAS Y NO EXPUESTAS O PLAGIFICIDAS ORGANOFOSFORADOS, BOGOTA 2012".

Versión número: 01

Sometidos por: la estudiante Diana Cecilia Márquez

Tutor: Prof. Fabio Ancizar Aristizabal

Presentado por: el Prof. Jairo Alfonso Téllez Mosquera, Coordinador

Departamento o Sección: de la Maestría en Toxicología

Fecha en que fue sometido a consideración del comité: 09 de agosto de 2012

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de Investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

El Comité de Ética de la facultad de Medicina certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación.
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos.
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica).

2. El presente proyecto fue EVALUADO por los siguientes miembros del Comité:

| | |
|--------------------------------|--|
| García Vega Óscar Armando | Departamento de Ciencias Fisiológicas |
| Guerrero Fonseca Carlos Arturo | Departamento de Ciencias Fisiológicas |
| Lara Díaz María Fernanda | Departamento de la Comunicación Humana |

Elib/ Jeannette P. Al-

145 años
Innovando

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
Correo electrónico: eticasalud_fmbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA

Mora Mercedes

Miembro Externo de La Comunidad Científica

3. El Comité consideró que el presente estudio:

- a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.
- b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas Imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité


6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del Informe de avance Integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

Concepto Aprobatorio

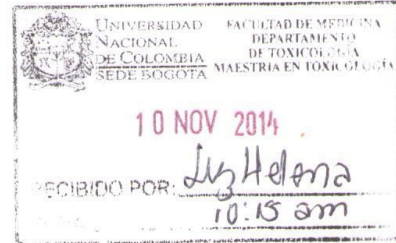

 Nombre: OSCAR A. GARCÍA VEGA
 Título: Md, MSc, PhD
 Cargo: Presidente COMITÉ DE ÉTICA
 Elb/ Jeannette P. Al-

145 años
INNOVANDO

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
Correo electrónico: eticasalud_fmhog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Bogotá, Noviembre 10 de 2014

Doctores
COMITÉ DE ÉTICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



Asunto: Información cambio de título.

Saludo respetuoso,

Me dirijo a ustedes respetuosamente, para informar sobre el cambio de título del proyecto titulado "CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL GEN DE LA PARAOXONASA-1 (PON -1), EN UNA MUESTRAS DE PERSONAS EXPUESTAS Y NO EXPUESTAS A PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS, BOGOTA 2012."; el cual contaba con aval del comité de ética, según acta N° 104 del 09 Agosto de 2012.

El nuevo título corresponde a, "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.", este cambio fue aprobado por el Consejo de Facultad en sesión del 16 de octubre de 2014, acta 35.

Agradezco la atención prestada.

Cordialmente,

Diana Cecilia Márquez Llanos
Estudiante de Toxicología
Código 05599336

Fabio Aristizabal Gutiérrez
Profesor Titular
Director de Tesis