

Máster Oficial
GENÉTICA Y EVOLUCIÓN
UNIVERSIDAD DE GRANADA



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Análisis genético-molecular de las variantes atípica y K de la
colinesterasa sérica y sus implicaciones toxicológicas

Alumno:

ANTONIO GÓMEZ MARTÍN

2011

Responsables de la Investigación Tutelada:

Prof. Dr. Antonio Hernández Jerez

Dr. Juan Carlos Álvarez Merino

ÍNDICE

Índice	3
RESUMEN	4
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
Características de los Invernaderos	7
Uso de Plaguicidas y Trabajadores	8
Enfermedades asociadas	10
Indicadores Biológicos	11
Biotransformación	11
Butirilcolinesterasa	13
Historia y antecedentes	14
Gen y estructura proteica	15
Fenotipado	17
Nomenclatura	18
Polimorfismos de BChE	19
Justificación del estudio	22
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
Sujetos de estudio	25
Recolección de muestras	25
Extracción del ADN	26
Análisis genético molecular:	27
Amplification-Created Restriction Sites (ACRS) en el caso de la variante K	27
Amplificación por PCR:	29
Digestión con enzimas de restricción	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	45
Referencias	46
Índice de Tablas	52

RESUMEN

La colinesterasa sérica (BChE) es una enzima de fase I (esterasa) que se sintetiza en el hígado y se libera al plasma. Desempeña un papel importante en la detoxificación de tóxicos inhibidores de acetilcolinesterasa, como por ejemplo los plaguicidas organofosforados (OPs) ampliamente utilizados en agricultura como fitosanitarios, especialmente en invernaderos. La evaluación del riesgo de los plaguicidas precisa de indicadores biológicos de susceptibilidad, entre ellos los polimorfismos genéticos de enzimas que metabolizan plaguicidas, que permiten detectar a personas especialmente vulnerables a los efectos tóxicos de estos agentes y que presentarían signos de toxicidad a dosis más bajas que el resto de la población.

En este estudio preliminar se ha puesto a punto un método de análisis genético para detectar las variantes atípica A y K de la enzima butirilcolinesterasa (BChE), producidas por mutaciones puntuales. La primera es, desde el punto de vista bioquímico, deficiente en la actividad catalítica y resistente a la inhibición por dibucaína. La segunda se asocia a una disminución en el número total de moléculas de BChE en suero y, por tanto, a una menor actividad catalítica.

A partir de un estudio previo en trabajadores de invernaderos expuestos a plaguicidas OPs se seleccionaron 31 individuos con fenotipo inusual de BChE en base a valores de la actividad enzimática en suero y a los test bioquímicos de inhibición. Se optimizó el método de extracción en muestras de sangre depositadas en papel FTA® y que tenían una antigüedad de 10 años. La técnica de análisis genético utilizado fue, en el caso de la variante BChE*A, la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior corte de los fragmentos amplificados con enzimas de restricción, visualizado en geles de agarosa. En el caso de la variante BChE*K se usó el método llamado *amplification-created restriction site* (amplificación del lugar de restricción, ACRS).

El método bioquímico para la adscripción del fenotipo de la BChE no permite identificar todos los individuos portadores del alelo K, mientras que sí lo ha hecho en el caso de los portadores del alelo A. Se ha detectado una asociación entre la variante A y la K, ya que no se han encontrado individuos portadores del alelo A que no presenten el alelo K, lo que parece indicador de desequilibrio de ligamiento. Estos resultados confirman la utilidad de biomarcadores genéticos en la monitorización de trabajadores expuestos a plaguicidas inhibidores de colinesterasa.

ABREVIATURAS

- A**
variante atípica o dibucaína resistente, 16
- A1**
Muestra utilizada como control en la extracción en FTA®, 30
- AChE**
Acetilcolinesterasa, 14, 15
- ACRS**
Amplification-Created Restriction Site, 27, 28
- ADNc**
ADN complementario, 15
- Ala**
aminoácido alanina, 37
- Asp**
aminoácido aspartato, 37
- BChE**
Butirilcolinesterasa, 15, 16, 17, 19, 22, 38, 39
- BCHE**
Butirilcolinesterasa, 15, 19, 20, 21
- BIO253**
número identificativo del grupo de investigación del departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada, 25
- BrEt**
bromuro de etido, 31, 32
- ESPAPP**
Programa de Vigilancia Epidemiológica de las Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas, 8
- F**
variante fluoruro o fluoruro resistente, 16
- FTA®**
Papel de filtro especialmente impregnado para la toma de muestras., 24, 25, 26
- Gly**
aminoácido glicina, 37
- H**
variante Hammersmith, 16
- Ha**
Hectárea, 7
- INC**
Instituto Nacional de Colonización, 6
- J**
variante James, 16
- K**
variante Kalow o alelo K, 16
- kb**
kilobases, 34
- NC**
Números de Cloruro, 17, 39, 41
- ND**
Números de dibucaína, 17
- NF**
Números de Fluoruro, 17, 41
- nm**
nanómetros, 17, 31
- pb**
pares de bases, 28, 29, 31, 35
- PCR**
Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa, 21, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35
- PCR-PIRA**
PCR introduced restriction analysis, 21
- PON1**
Paraoxonasa Tipo 1, 13
- punch**
trozo de papel FTA® de forma circular y 1.2 mm de diámetro recortado con el instrumento Harris Micro-punch®, 29
- RCSB**
Research Collaboratory for Structural Bioinformatic, 15
- REDIAM**
La Red de Información Ambiental de Andalucía, 6, 7
- S**
variante silente, 16
- SNP**
Single Nucleotide Polymorphism, 19, 21, 22
- TBE**
Buffer Tris-Borato- EDTA, 31
- Thr**
aminoácido treonina, 37
- U**
variante usual, 16
- U/I**
Unidades de enzima por litro de sangre, 17, 37, 39, 41
- variante K**
Variante Kalow, 17, 27, 28, 30, 31, 33, 34, 38, 39
- Vf**
Volumen final, 34

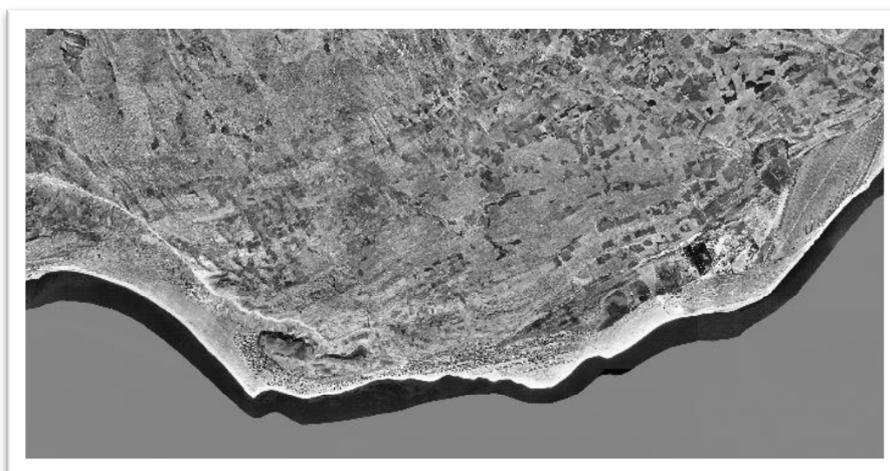
INTRODUCCIÓN

Andalucía es la región que consume más plaguicidas de España para el control de plagas y mejora de la producción agrícola. Según el Instituto Nacional de Estadística, las ventas de plaguicidas en el año 2008 supusieron un total de 94.549 toneladas en toda España, de las cuales 31.163 (33%) tuvieron lugar en Andalucía, lo que representa la mayor cantidad de plaguicidas vendidos en todo el país. La zona del sureste de España ha experimentado un importante aumento de la agricultura intensiva en los últimos cuarenta años mediante el uso de invernaderos, lo que ha permitido incrementar la productividad agrícola. Dentro de ella destaca la comarca de El Poniente de Almería, una de las mayores concentraciones de invernaderos del mundo. Actualmente, en los principales municipios de esta zona se producen y se comercializan casi la mitad de las hortalizas obtenidas en toda Andalucía. (Jiménez Díaz, 2008).

Hasta 1970 el Poniente almeriense se encontraba en una situación de depresión demográfica y económica, con grandes carencias en infraestructuras y tejido industrial (Imagen 1). El clima almeriense presenta unas características desfavorable para la agricultura tradicional: suelos de mala calidad, escasez e irregularidad de lluvias, pocos recursos hidráulicos de superficie y fuertes vientos. Estas dificultades empezaron a solucionarse cuando se posibilitó el acceso a los acuíferos subterráneos a partir de la actuación del Estado mediante el Instituto Nacional de Colonización (INC). De esta manera, pudo romperse el bloqueo tecnológico que, de otra manera, habría impedido la implantación de otras innovaciones técnicas posteriores como fueron los cultivos enarenados o los invernaderos.

Imagen 1: Fotografía aérea de la comarca del poniente de Almería en 1956

Fuente: La Red de Información Ambiental de Andalucía (REDIAM)



Características de los Invernaderos

La agricultura intensiva constituye un sistema complejo y dinámico, que concentra grandes cantidades de agua, mano de obra y diferentes sustancias químicas sobre un suelo artificial, el cual está protegido por plástico. El uso de invernaderos posibilita una mayor precocidad de los cultivos y la obtención de cosechas en épocas adelantadas en relación al resto de España y Europa. La agricultura intensiva ha de disponer de altos consumos intermedios, gran cantidad de mano de obra y una tecnología cada vez más avanzada (Aznar-Sánchez & Sánchez-Picón, 2010).

La superficie de El Poniente almeriense dedicada a la producción agrícola bajo invernadero ha crecido de forma espectacular en los últimos treinta años, pasando de apenas 3.000 hectáreas en 1975 a más de 26.000 en 2008 (Imagen 2). Esta cifra hace que Almería sea la provincia española con mayor superficie invernada en España, país que a su vez es el que más número de hectáreas invernadas tiene en toda la cuenca mediterránea por encima de Italia, Turquía, Marruecos, Francia e Israel (Aznar-Sánchez & Sánchez-Picón, 2010).

Imagen 2: Fotografía aérea de la comarca del poniente de Almería en 2009
Fuente: La Red de Información Ambiental de Andalucía (REDIAM)



En cuanto a la provincia de Granada, los cultivos de invernadero se han extendido hacia la franja costera del este de Motril con gran rapidez, pasando de 118 Ha en 1984, a cerca de 2.400 Ha según datos más recientes (Manzano-Aglugliaro, 2007). Los invernaderos andaluces, localizados en su mayor parte en Almería y Granada, tanto de frutas como de hortalizas, concentran casi el 60% de la superficie invernada española, proporcionando el 18,8% de la producción vegetal total, a la vez que representan el 60% de la producción hortícola total de Andalucía. El clima en estas regiones ha sido determinante en el éxito de este tipo de cultivos bajo plástico. Su particular microclima resulta idóneo para el desarrollo de los cultivos hortícolas tempranos: temperaturas suaves, reducidos saltos térmicos entre el día y la noche,

elevado nivel de insolación, poca humedad, escasez de heladas y precipitaciones, etc. (Alfredo Tolón & Xavier Lastra, 2010).

La humedad, calidad del aire, temperatura y suplenia de agua son cuidadosamente controladas dentro del invernadero. El uso de plaguicidas es habitual y mayor que en las demás formas de agricultura. Por término medio se utilizan 40 kg de diferentes plaguicidas por hectárea a lo largo de una campaña de cultivo en invernaderos. Esta cantidad sería incluso mayor si se consideran también los productos utilizados en la desinfección de los terrenos (Jiménez Guerrero, 2010).

Las características de la agricultura de invernadero (alta temperatura, alta humedad, y área cerrada) favorece la aparición de una serie de plagas que justifican el uso de plaguicidas para evitar mermas en la productividad agrícola. Estos plaguicidas, sin embargo, son la fuente de importantes riesgos tóxicos para los trabajadores expuestos a ellos y para el medio ambiente.

Uso de Plaguicidas y Trabajadores

Los trabajadores que manejan plaguicidas están expuestos a los mismos durante la dilución, mezcla y llenado de los recipientes o cubas y los equipos de pulverización. Posteriormente están expuestos también a los aerosoles de plaguicidas durante su aplicación a los cultivos. Los organofosforados (OPs) han sido los plaguicidas más usados en todo el mundo con el fin de aumentar la producción agrícola (WHO, 1990). Hoy en día están siendo sustituidos por los carbamatos, piretroides y endosulfán, único organoclorado que se degrada más fácilmente (A. F. Hernandez et al., 2003).

El período de tiempo necesario para fumigar una hectárea de tierra es muy variable y puede oscilar entre 6 y 12 horas. Algunos trabajadores expuestos son fumigadores regulares y otros son esporádicos, es el caso de trabajadores que cultivan sus propios invernaderos (Parron, Hernandez, & Villanueva, 1996).

El uso extensivo de plaguicidas a nivel mundial, principalmente los compuestos OPs, supone numerosas intoxicaciones agudas al año. En los siete años que van desde el 2000 al 2006, se registraron un total de 597 intoxicaciones agudas por plaguicidas en el Programa de Vigilancia Epidemiológica de las Intoxicaciones Agudas por Plaguicidas (ESPAPP) en Almería. Esto supone una incidencia anual de 16 casos por cada 100.000 habitantes y 43 casos por cada 100.000 trabajadores, lo que es más del doble de la tasa descrita en los Estados Unidos. La mayoría de ellas (78.7%) son de carácter ocupacional y un 9.9% son de etiología suicida (A. F. Hernandez, Parron, Serrano, & Marin, 2010). Las características especiales de los invernaderos (espacio

cerrado, alta temperatura y alta humedad) son factores que contribuyen a facilitar la absorción de plaguicidas en la medida en que el uso del equipo de protección personal es insuficiente (Imagen 3). Sin embargo, el tamaño del aerosol es bastante grande, de modo que es poco probable que alcance el espacio alveolar, por lo que no se absorbería a través de los pulmones; sin embargo, si ejercerían un efecto local sobre las vías respiratorias. Por el contrario, la piel es la vía más importante de absorción en el medio laboral debido a la lipofilicidad de los OPs y las condiciones ambientales en los invernaderos que dan lugar a la vasodilatación cutánea. El uso inapropiado de ropa protectora y equipos de protección personal acentúa el problema. (A. F. Hernandez et al., 2003).

Imagen 3: Ejemplos de invernaderos en Almería

Fuente: <http://peruergo.blogspot.com/2010/03/la-ual-realiza-los-primeros-estudios.html>



Fuente: <http://alinverspain.com/imagenes/fotos-contenido/invernaderos-parral-1.jpg>



Los efectos tóxicos de los OPs están en gran medida asociados a la exposición aguda a altas concentraciones de estos compuestos que inhiben la acetilcolinesterasa, enzima implicada en la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina en las terminaciones nerviosas y unión neuromuscular (Cataño, Carranza, Huamani, & Hernandez, 2008).

La intoxicación aguda por estos compuestos da lugar a un patrón consistente de síntomas físicos, pero también tienen efectos psicológicos y neuroconductuales, tales como ansiedad, depresión y deterioro cognitivo. Diversos estudios efectuados en trabajadores crónicamente expuestos a plaguicidas han mostrado múltiples déficits neuropsicológicos, entre ellos sintomatología afectiva, que incluso puede persistir mucho tiempo después de una exposición aguda.

Los efectos sobre la salud de la exposición a plaguicidas en dosis bajas son muy difíciles de delimitar, sobre todo cuando se utilizan mezclas de plaguicidas. Esta circunstancia suele producirse en las prácticas de agricultura intensiva, como son los invernaderos de plástico. Se han utilizado dos tipos de medidas para evaluar la exposición a estos compuestos: actividad de

enzimas en sangre, y la biomonitorización de plaguicidas y sus metabolitos en orina o sangre. Sin embargo, la inadecuada relación dosis-respuesta hace que esta última determinación se utilice sólo como indicador biológico de exposición, para confirmar la exposición o estimar la dosis interna. Además, individuos con similar perfil de exposición a plaguicidas pueden producir efectos biológicos muy diferentes (A. Hernandez et al., 2004).

La OMS ha revisado los efectos de la exposición a los plaguicidas en el ambiente de trabajo, pero hay una escasez de datos clínicos al respecto. Las anormalidades clínicas observadas hasta la fecha sugiere la afectación de muchos órganos, incluyendo los sistemas respiratorio, digestivo y nervioso.

Mientras que la exposición aguda es fácil de detectar y diagnosticar, los efectos derivados de la exposición prolongada a dosis bajas de plaguicidas (exposición crónica) son a menudo difíciles de evaluar ya que los estudios clínicos y epidemiológicos no han identificado hasta el momento cambios bioquímicos relacionados con los resultados clínicos. Por este motivo, los esfuerzos se dirigen a evaluar la toxicidad de estas sustancias químicas por medio de biomarcadores sensibles, aunque el hallazgo de algunas alteraciones bioquímicas no siempre es indicativo de la aparición de síntomas clínicamente reconocibles (A. F. Hernandez et al., 2005).

Enfermedades asociadas

Cada vez hay más evidencias de que la exposición crónica a plaguicidas se asocia con un deterioro de la salud, pudiendo producir neurotoxicidad, carcinogénesis, inmunotoxicidad y efectos sobre la reproducción y el desarrollo. Sin embargo, dada su baja incidencia, sería necesario identificar los mecanismos por los que estos productos químicos pueden contribuir a estos efectos crónicos (A. F. Hernandez et al., 2006). Aunque aún no se ha determinado la relación causal directa entre tales efectos y la exposición a plaguicidas, existe cada vez mayor preocupación en los países desarrollados acerca de los riesgos potenciales que pueden producir estos compuestos sobre la salud.

Las formulaciones comerciales de plaguicidas pueden tener también efectos irritantes por el contacto con la piel o membranas mucosas (ojos, nariz, vías respiratorias). Esta toxicidad es de tipo local en vez de sistémico y ha recibido menos atención, probablemente porque causa problemas de salud menos graves.

Los agricultores pueden estar inadvertidamente expuestos a plaguicidas a través de la piel y la inhalación durante períodos prolongados durante la campaña agrícola. Las condiciones

ambientales de los invernaderos son de especial interés, ya que pueden permanecer suspendidas en el aire pequeñas gotitas de aerosoles por más tiempo de lo habitual después de ser rociados. Además, las altas temperaturas en el interior del invernadero favorecen la volatilización de algunos plaguicidas. Una vez inhalados, sus aerosoles o vapores pueden reaccionar con las vías respiratorias, produciendo efectos irritantes y estrechamiento de las mismas. Por otra parte, si el tamaño de las gotas del aerosol es suficientemente pequeñas, puede alcanzar el espacio alveolar y, por tanto dañar la membrana del alveolo-capilar, produciendo un deterioro en la difusión de gases (A. F. Hernandez et al., 2008).

Indicadores Biológicos

La evaluación del riesgo de los plaguicidas precisa de indicadores biológicos de exposición (plaguicidas o sus metabolitos en fluidos biológicos), de efecto (determinación de las colinesterasas u otras enzimas) y 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.

Los trabajadores agrícolas de invernadero están expuestos con frecuencia a numerosos plaguicidas o mezclas de los mismos, ya sea simultánea o secuencialmente, lo que hace difícil identificar los efectos de cada compuesto en particular. La relación entre los efectos citotóxicos de los plaguicidas y sus enfermedades clínicas no está todavía resuelta. En este sentido, el uso de biomarcadores puede ser de utilidad para detectar los efectos precoces de los plaguicidas antes de que aparezcan los efectos clínicos (A. F. Hernandez et al., 2003).

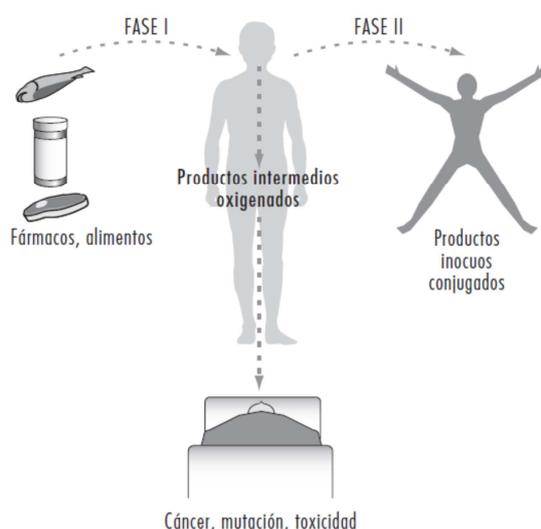
Biotransformación

Algunos de los efectos que pueden causar los plaguicidas sobre las personas expuestas pueden estar modulados por el polimorfismo de diversos enzimas implicados en su biotransformación (Lewalter & Leng, 1999). Vamos a detallar concretamente el caso de los plaguicidas organofosforados, objeto de nuestro estudio.

Por medio del metabolismo, los xenobióticos liposolubles presentes en el organismo se pueden transformar en metabolitos hidrosolubles que se excretan más fácilmente (Figura 1). Este proceso tiene lugar principalmente en el hígado y se divide en dos fases. En una primera fase (Fase I) las enzimas contenidas en las células hepáticas producen una desulfuración oxidativa de los insecticidas organotiofosforados, activándolos de este modo. Esta fase de bioactivación puede generar sustancias de alta capacidad tóxica ya que los metabolitos

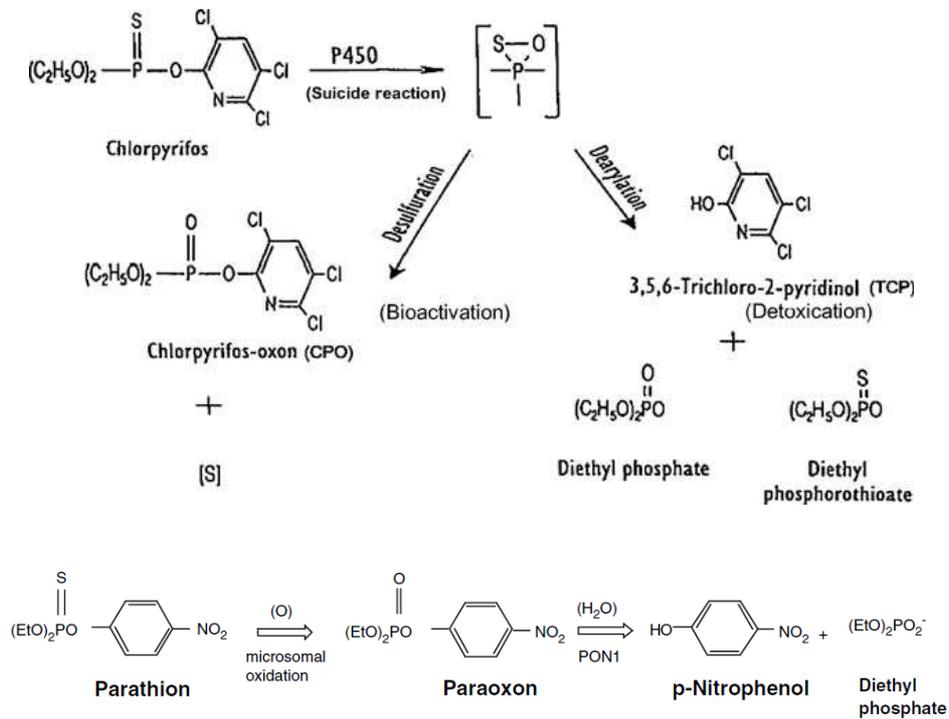
formados pueden lesionar los tejidos mediante diferentes mecanismos, entre ellos, por estrés oxidativo (K.Silbergeld, 2001). Esta fase está mediada por citocromos P450 (CYP450). Dichas reacciones pueden estar catalizadas por las subfamilias CY1A2, 2B6 y 2C19 cuando son dosis bajas (10 mM), mientras que a dosis altas la isoenzima que opera es la CYP3A4 (Usmani, Hodgson, & Rose, 2004).

Figura 1: Expresión clásica de las Fases I y II de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos o fármacos (K.Silbergeld, 2001)



Posteriormente, el metabolito activo resultante, denominado oxón, es hidrolizado posteriormente en el hígado por medio de las esterasas tipo A, concretamente la paraoxonasa (PON1). Si alcanzan el torrente sanguíneo sin ser hidrolizados, estos metabolitos activos interactúan estequiométricamente con determinadas esterasas séricas como la butirilcolinesterasa (BChE) y carboxilesterasa (CarbE) y catalíticamente con la PON1. En la Fase II del metabolismo, hay otras enzimas que se encargan de conjugar el metabolito primario con un sustrato endógeno, de manera que la molécula se hace más grande y más polar, lo que facilita su eliminación o excreción. Un ejemplo que interviene en el caso de los plaguicidas organofosforados son las glutatión S-transferasas (GST). En general, las enzimas de fase II desempeñan un papel importante en la detoxificación de estos compuestos químicos (Furlong, 2007).

Figura 2: Vía del citocromo P450/PON1 de bioactivación y detoxificación
(Costa & Eaton, 2006; Furlong, 2007)



La susceptibilidad individual juega un papel crítico en la evaluación de la exposición a plaguicidas, porque a igualdad de exposición determina que algunos individuos presenten síntomas clínicos e incluso intoxicación franca mientras que en otros no (A. F. Hernandez et al., 2005). Esta variabilidad entre individuos determina la diferente capacidad para metabolizar plaguicidas y puede ser debida al balance en los perfiles metabólicos de los CYP450s y esterasas, tanto de tipo A (PON1), como las de tipo B (BChE). Por lo tanto los polimorfismos genéticos de CYP1A2, 2B6, 2C19, 3A4, PON1, BChE y GST pueden predisponer a la toxicidad de los plaguicidas en determinados subgrupos de la población general (Furlong, 2007).

Butirilcolinesterasa

En nuestro estudio nos centraremos en la butirilcolinesterasa (BChE, EC 3.1.1.8, OMIM 177400), ya que es muy común utilizar la actividad de este enzima en plasma o suero como índice de exposición a plaguicidas OPs. No obstante, no existen evidencias de una relación entre alteraciones de la BChE con la existencia de síntomas clínicos (Cataño et al., 2008).

Historia y antecedentes

La butirilcolinesterasa fue aislada por primera vez del suero de caballo en 1930 y presentaba la característica bioquímica de hidrolizar ésteres de colina. Hay dos formas de colinesterasa que difieren según sus propiedades bioquímicas y la fracción de sangre en la que se encuentran, la plasmática y la eritrocitaria. La primera que se descubrió fue la colinesterasa específica, posteriormente llamada acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.17), la cual hidroliza acetilcolina y está localizada en la membrana de los eritrocitos. Desempeña un papel crítico en la modulación de la transmisión de la señal neuronal. Más tarde, se descubrió otra enzima que metabolizaba sustratos que contienen ésteres, que se conoce como butirilcolinesterasa, también llamada pseudocolinesterasa o colinesterasa inespecífica, la cual es sintetizada por el hígado y posteriormente se libera al plasma. Su función está menos definida, pero la mayoría de estudios sugieren que se encarga de eliminar de la sangre aquellos tóxicos que inhiben la AChE y, en consecuencia, alterarían la señal neuronal.

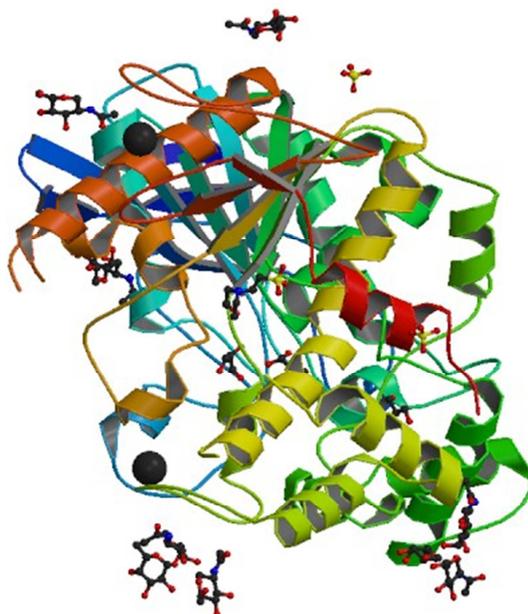
La deficiencia congénita de colinesterasa sérica es muy conocida por anestesistas en el control preoperatorio, ya que origina una reacción prolongada a agentes bloqueantes neuromusculares tales como la succinilcolina (Jensen, Skovgaard, & Viby-Mogensen, 1995). En estos casos tales agentes no se eliminarían correctamente, provocando graves complicaciones como parálisis muscular y apnea. Se ha propuesto implantar este biomarcador en la vigilancia de la salud de los trabajadores de invernadero con el objetivo de monitorizar a aquéllos que aplican insecticidas anticolinesterásicos (organofosforados y carbamatos), para así detectar los que presentan baja actividad enzimática y que, por tanto, serían más susceptibles a estos plaguicidas (Lockridge & Masson, 2000). El déficit congénito de la colinesterasa sérica no constituye un riesgo específico frente a la toxicidad de los organofosforados o carbamatos, la cual se ejerce a nivel de los neuroreceptores. Sin embargo, estos individuos podrían tener un mayor riesgo debido a un peor potencial estequiométrico (A. F. Hernandez et al., 2000).

En estudios familiares se ha podido apreciar que varios miembros de una misma familia tienen en común una baja actividad de BChE, lo que sugiere que este rasgo es heredable. A partir de ese momento se detectaron varias mutaciones de BCHE que producen alteraciones de su actividad bioquímica. Por eso, se pueden encontrar individuos con ciertos genotipos de BChE que los hacen más sensibles a la exposición a inhibidores de colinesterasa presentes en el ambiente (Costa & Eaton, 2006).

Gen y estructura proteica

En 1987 se clonó el ADNc (ADN complementario) que codifica la proteína BChE de 574 aminoácidos (Arpagaus et al., 1990), repartidos en 4 subunidades idénticas. El gen bche humano se localiza en el cromosoma 3 (3q26) (Allderdice et al., 1991) y está compuesto por 4 exones separados por tres intrones largos que ocupan en total 73 kilobases. El exón 2 es largo y codifica el 83% de la subunidad de BChE, incluyendo el centro activo en el aminoácido 198. Está estructuralmente relacionado con AChE, compartiendo aproximadamente un 50% de los aminoácidos (Ver Figura 3).

Figura 3: Estructura cristalina de la butirilcolinesterasa humana
Fuente: RCSB Protein Data Bank



Las variaciones genéticas son uno de los factores determinantes de la actividad de BChE en plasma. El 6-7% de la población tiene actividad anormal de BChE y cerca del 65% de todos los casos de bloqueo neuromuscular prolongado por succinilcolina son debidos a factores genéticos (Viby-Mogensen, 1983).

La mayoría de las mutaciones de BChE suceden en la región codificante del gen, dando como resultado la alteración de la actividad enzimática. Se conocen actualmente unas 40 mutaciones, de las cuales 30 causan silenciamiento de la actividad de BChE, provocando su disminución en más del 90% de los casos. Sin embargo, estas mutaciones son extremadamente raras en la población, y menos aún que se encuentren en homocigosis, es decir, individuos con nula actividad de la enzima.

Las siete variantes genéticas más importantes son (ver Tabla 1) : la usual (U), la atípica o dibucaína resistente (A), la fluoruro resistente (F), la silente (S) y tres de tipo cuantitativo, variante K (Kalow), J (James) y H (Hammersmith) (Garry et al., 1976; Rubinstein, Dietz, & Lubrano, 1978; Whittaker & Britten, 1987). La identificación de cada una de estas variantes usando solo análisis bioquímicos, como son los test de inhibición enzimática, no consigue abarcar todos los tipos ya que es muy complicado o casi imposible poder diferenciar si la baja actividad enzimática detectada se debe a que el individuo posee una enzima con baja actividad catalítica o a que las concentraciones de enzima son menores (ver Figura 4).

Figura 4: Esquema explicativo sobre la dificultad de diferenciar la variante atípica de la variante K

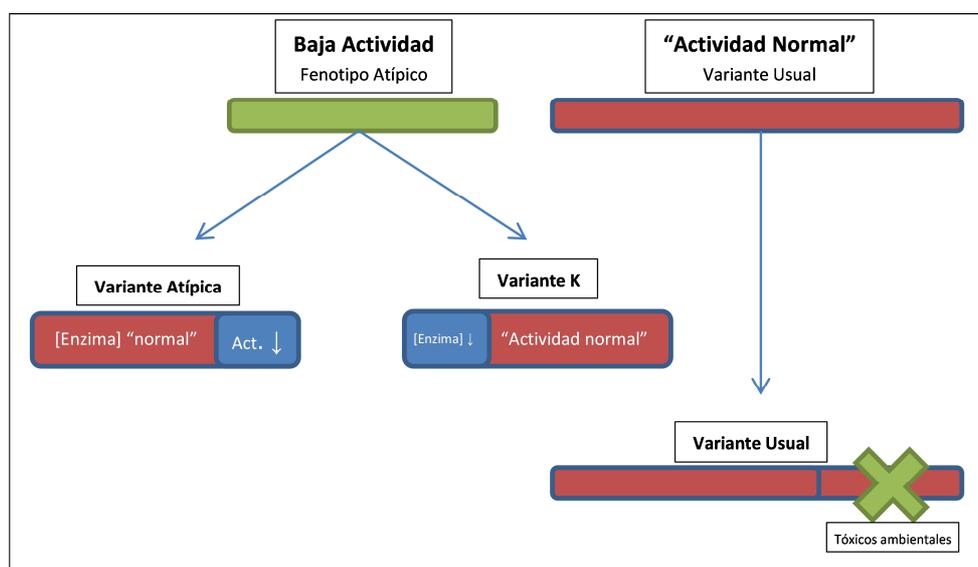


Tabla 1. Características de las variantes genéticas más conocidas de BChE

Nombre común	Símbolo	Fenotipo	Mutación del ADN (5'→3')	Aminoácido alterado	Frecuencia ¹	Actividad (%)	Diana de restricción
Usual	U	-	Ninguna	Ninguno	0.870	100	-
Atípica	A	Dibucaína resistente	nt209(GAT→GGT)	Asp70Gly	0.020	70	Pérdida de Sau3AI
Silente	S	Sin apenas actividad	>30 mutaciones		0.003	0-10	-
Fluoruro	F1	Fluoruro resistente	nt728(ACG→AIG)	Thr243Met	0.003	60	Pérdida de Maell
Fluoruro	F2	Fluoruro resistente	nt1169(GGT→GTT)	Gly390Val	0.003	60	Pérdida de HphI
Kalow	K	Cuantitativa	nt1615(GCA→ACA)	Ala530Thr	0.113	50	Ninguna
James	J	Cuantitativa	nt1490(GAA→GTA)	Glu497Val	raro	No determinado	Crea RsaI
Hammersmith	H	Cuantitativa	Nt424(GTG→ATG)	Val142Met	raro	10	Ninguna

¹ Tabla adaptada de datos recogidos en Whittaker, 1986; Lockridge & Masson, 2000 y Goodall, 2004

Fenotipado

La actividad colinesterasa sérica (BChE) se determina espectrofotométricamente a 240 nm por el método de Kalow y Lindsay (Kalow & Lindsay, 1955) usando la benzoilcolina como sustrato. La actividad BChE en presencia de distintos inhibidores, como la dibucaína (Kalow & Staron, 1957), el fluoruro sódico (Harris & Whittaker, 1961) y el cloruro sódico (Whittaker & Britten, 1985), permite poder adscribir un determinado fenotipo a un individuo en concreto. Para la determinación del fenotipo de colinesterasa sérica se suele hacer uso de los datos presentados en la Tabla 2 en la que se tiene en cuenta tanto la actividad benzoilcolinesterasa obtenida como los diferentes números de inhibición (Whittaker, 1984).

Tabla 2: Metodología para la adscripción del fenotipo sérico de colinesterasa en cada muestra.
(Whittaker, 1984)

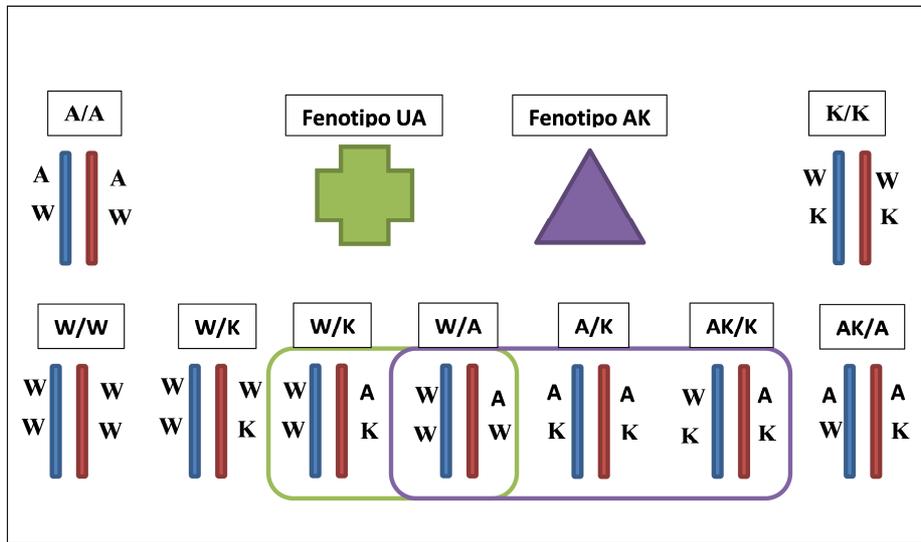
Fenotipo	Actividad BChE (U/I)	Números de Dibucaína (ND)	Números de Fluoruro (NF)	Números de Cloruro (NC)
UU	650-1450	78-83	56-69	9-23
US	450-1015	78-83	56-69	9-23
UA	500-1115	48-69	44-54	19-35
UK*	387-938	79-86	58-66	-*
AK*	341-826	46-59	34-48	-*
AA	345-770	12-25	15-33	43-63
AF	385-855	41-54	28-44	22-38
UF	560-1250	70-83	46-54	5-32
FF	360-800	64-66	31-37	26

* Según Jensen et al (1996)

El método introducido por Kalow y Genest (1957), basado en el número de dibucaína, es un método excelente y seguro para determinar si un individuo posee la colinesterasa atípica. El alelo atípico puede ser detectado tanto en homocigosis como en heterocigosis. Sin embargo, como se ha explicado anteriormente, con los test de inhibición es difícil o casi imposible en alguno de los casos, determinar si un individuo es portador de alguna variante cuantitativa. Mediante los test de inhibición de la colinesterasa sérica podemos llegar a diferenciar la variante K de la usual, cuando en ambos se encuentra presente la variante atípica, esto es el fenotipo AK del fenotipo UA. Sin embargo, gracias al genotipado de estos individuos se puede

comprobar que el fenotipo AK corresponde a tres posibles genotipos (A/K, AK/K y W/A) y en el caso del fenotipo UA corresponde a dos posibles genotipos (W/A y W/KA). Con el fin de aclarar estos conceptos ver Figura 5 y el apartado “Nomenclatura” de la página 18.

Figura 5: Esquema gráfico de los haplotipos posibles para cada fenotipo y su representación según nomenclatura.



Nomenclatura

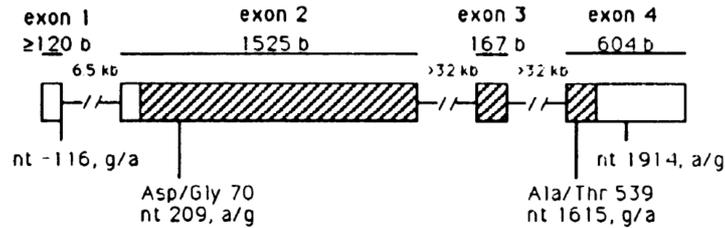
Es necesario detenerse a explicar la nomenclatura que se usa a lo largo de este trabajo en cuanto a las abreviaturas usadas para cada haplotipo, representando de esta forma las diferentes combinaciones alélicas de los dos loci estudiados. Se tendrá en cuenta la nomenclatura propuesta por La Du et al (1991) con algunas modificaciones. Las abreviaturas están compuestas por un sistema de dos, tres y cuatro letras, separadas por una barra oblicua (ver Figura 5). La abreviatura de cuatro letras solo se usa en el caso de que el haplotipo contenga los genotipos homocigotos para las dos variantes, es el caso de AK/AK. En la abreviatura de tres letras se usa en el caso que uno de los genotipos sea heterocigoto y el otro sea homocigoto para la variante, es el caso de AK/A y AK/K.

La modificación que se ha hecho a esta nomenclatura (La Du, Bartels, Nogueira, Arpagaus, & Lockridge, 1991) ha sido sustituir la letra U, la forma de representar el alelo usual, por la letra W (Wildtype). El motivo de este cambio es evitar la posible confusión derivada de utilizar la letra U para denominar tanto el fenotipo y genotipo de los individuos portadores del alelo usual (Mollerup & Gatke, 2011).

Polimorfismos de BChE

De entre los polimorfismos anteriormente citados, nos centraremos en dos de ellos, ya que van a ser el objeto de nuestro estudio, que son la variante Atípica (McGuire et al., 1989) y la variante K (Bartels et al., 1992) . Se pueden ver localizadas en la Figura 6 y Figura 9.

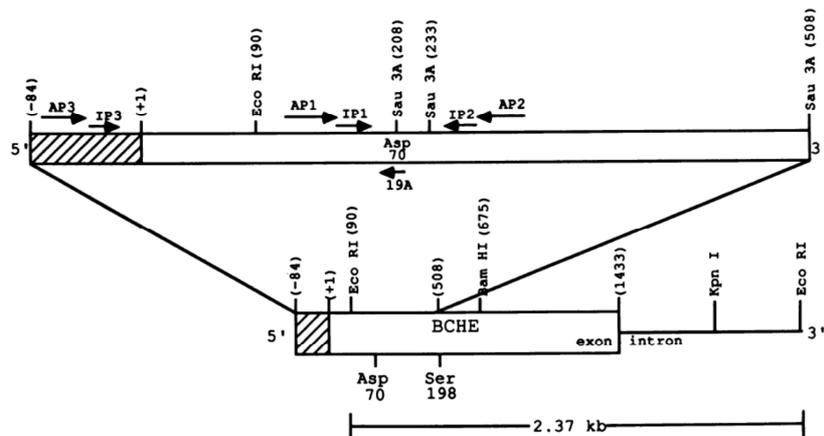
Figura 6: Esquema del gen BCHE, mostrando la localización de la variante atípica y K. (Bartels et al., 1992)



Variante Atípica

Enzima deficiente en la capacidad para hidrolizar la succinilcolina, debido a una mutación puntual (GAT→GGT) en el nucleótido 209 del exón 2, cambiando el aminoácido aspártico (ácido) a glicina (neutro) del condón 70 (ver Figura 7), cercano al sitio activo, dando como resultado una proteína con la afinidad reducida al 70% para los ésteres de colina. Este SNP (Single Nucleotide Polymorphism), rs1799807, altera un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción, en este caso hay una pérdida del punto de corte de la enzima Sau3AI, isoesquizómero de la enzima MboI (ver Tabla 3). La forma atípica de la enzima representa uno de los alelos de BChE más frecuentes, aproximadamente 1 de cada 25 individuos tiene al menos una copia de la variante. Por otro lado, este polimorfismo depende de un componente étnico, es el caso de los estudios en la población japonesa donde rara vez se ha encuentra este alelo (Costa & Eaton, 2006).

Figura 7: Esquema centrado en la zona del gen BCHE donde se localiza la variante atípica.
(McGuire et al., 1989)

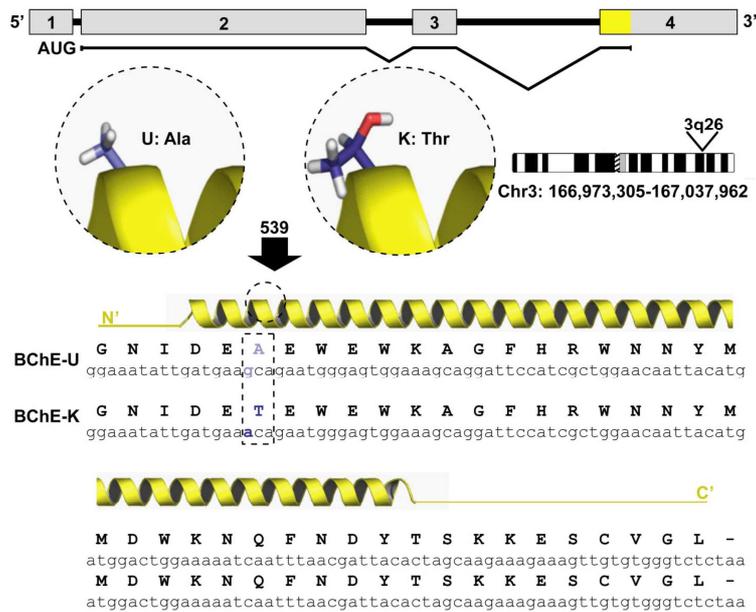


Variante Kalow

Llamada así en honor a Werner Kalow, fue el primero en identificar su fenotipo a través del uso del test de inhibición por dibucaína (Rubinstein et al., 1978). Estos autores observaron que el fenotipo AK experimenta una menor inhibición por dibucaína que el UA y también que la tercera parte de disminución de la actividad BChE es consecuencia de la presencia del alelo o variante K. Sin embargo, como se explicará más adelante, solo en ese caso de heterocigosis sería posible discriminar las variantes cuantitativas de la usual (Bartels et al., 1992).

Esta variante se debe a una mutación puntual (**GCA**→**ACA**) en el nucleótido 1615 del exón 4, viéndose afectada la región reguladora, sustituyendo el aminoácido alanina por treonina del codón 539 situado en el extremo C-terminal, el cual es esencial para la tetramerización (ver Figura 8). Todo esto da como resultado una menor síntesis de la proteína, y por tanto unos niveles más bajos en sangre, lo que provoca una reducción de la actividad enzimática al 50%.

Figura 8: Gen y producto de la proteína de la BCHE con la variante usual y K.
(Podoly et al., 2009)



Este SNP (Single Nucleotide Polymorphism), rs1803274, desafortunadamente no crea ni destruye ningún sitio de reconocimiento de alguna enzima de restricción, por este motivo, como se indicará en el apartado de material y métodos, es necesario generarlo gracias al método llamado “PCR introduced restriction analysis” (PCR-PIRA) (Shibuta, Abe, & Suzuki, 1994) o también conocido como “Amplification-Created Restriction Site”(Jensen, Nielsen, & Schwartz, 1996) (Altamirano, Bartels, & Lockridge, 2000).

La variante K, la cual determina una actividad enzimática más baja, representa el polimorfismo de BChE con mayor distribución en la población, ya que aproximadamente 1 de cada 4 personas son portadoras del alelo (Costa & Eaton, 2006). Esta alta frecuencia en la población la convierte en la variante idónea para evaluar el mayor riesgo derivado de la exposición crónica a plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. Sin embargo, esta pequeña disminución no ocasiona síntomas clínicos, como la respuesta prolongada a succinilcolina, aunque en combinación con otros factores que disminuyan también la actividad BChE, como la variante atípica, sí podría contribuir a tales efectos (Bartels et al., 1992).

Aunque la reducción en la actividad de BChE debido solo a la variante K no es suficiente como para producir respuesta prolongada a succinilcolina, puede llegar a serlo si se combina con otros factores que disminuyan la actividad BChE, tales como embarazo, poca grasa corporal, enfermedades, compuestos anticolinesterásicos, etc. (Whittaker, 1986)

Figura 9: Esquema de la localización genómica de las variantes de BChE.
(La Du et al., 1990)

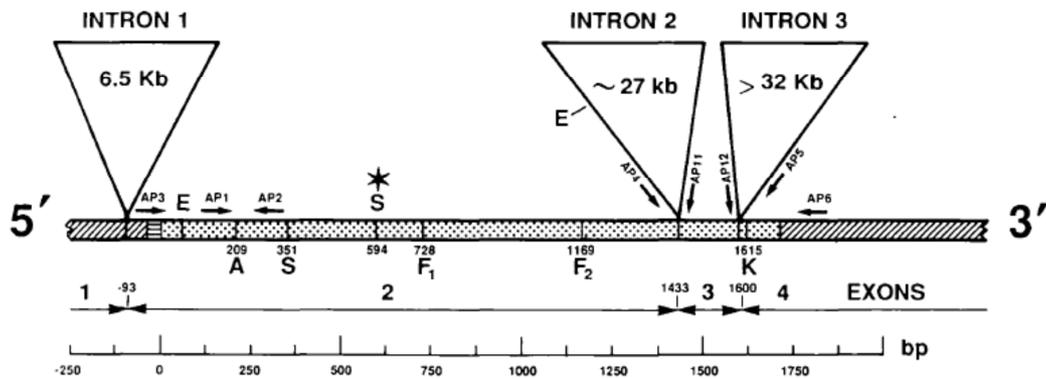


Tabla 3. Resumen de las características de las variantes genéticas de estudio

	Variantes Genéticas	
	Atípica	Kalow
Símbolo	A	K
Actividad BChE	70% Resistente a la inhibición por dibucaína	Actividad reducida 1/3 Cuantitativa: Bajos niveles de enzima
Localización	3q26 (exón 2) Cerca del centro activo	3q26 (exón 4) Cerca de la región reguladora
Mutación	Asp70Gly nt 209(GAT/GGT)	Ala539Thr nt 1615(GCA/ACA)
SNP ID	rs1799807	Rs1803274
Frecuencia Alélica	0.02 (McGuire et al., 1989)	0.113(Rubinstein et al., 1978)
Diana de Restricción	Pérdida de Sau3AI (isoesquizómero de MboI)	Amplification-created restriction sites (ACRSs): MaellI
Sensibilidad	Deficiencia en la capacidad de hidrolizar succinilcolina	

Justificación del estudio

En un estudio anterior del grupo de investigación realizado en trabajadores de invernadero expuestos a plaguicidas y controles no expuestos se determinó, entre otros parámetros bioquímicos, funcionales y clínicos, el fenotipo sérico de BChE. Sin embargo, no se pudo adscribir correctamente un fenotipo concreto a todos los portadores de fenotipos inusuales ya que los test bioquímicos de inhibición no permiten su individualización, tal y como se ha mencionado anteriormente. Por eso, el grupo se planteó la necesidad de realizar la

caracterización genético-molecular de todos los fenotipos inusuales y ver el grado de concordancia entre fenotipo-genotipo en cada caso.

Este estudio preliminar pretende abordar dicha caracterización genética y, de camino, optimizar dicho procedimiento para ser utilizado posteriormente en otro estudio actualmente en marcha dentro del marco de un proyecto de excelencia de la Consejería de Innovación de la Junta de Andalucía (P09-CVI-5062) y que será motivo de una tesis doctoral posterior. En ella se incluirán una serie de SNPs de diferentes genes que codifican enzimas implicadas en la biotransformación y detoxificación de plaguicidas en el organismo, tales como el citocromo P450 (CYP), paraoxonasa (PON1), glutatión-S-transferasa (GST) y el resto de variantes no estudiadas de la butirilcolinesterasa (BCHE).

OBJETIVOS

- Optimizar el método de extracción de muestras de sangre depositadas en papel FTA® con una antigüedad superior a 10 años.
- Poner a punto y optimizar el protocolo para el genotipado de las variantes genéticas Atípica y K del gen de la butirilcolinesterasa.
- Determinar el grado de concordancia entre el genotipado de los alelos BCHE*A y BCHE*K y el fenotipado sérico de BChE en una muestra de 31 individuos que presentaban un fenotipo inusual de BChE en un estudio anterior.

METODOLOGÍA

Sujetos de estudio

En este estudio se seleccionaron 31 individuos que presentaron fenotipos diferentes al usual de colinesterasa sérica y que formaban parte de un total de 135 trabajadores de invernadero que fueron objeto de un estudio previo de nuestro grupo de investigación BIO253 que dio lugar a la tesis doctoral titulada “Interés de diversos marcadores bioquímicos de estrés oxidativo en la patogenia y diagnóstico precoz de la intoxicación crónica por plaguicidas en fumigadores de invernadero (López Guarnido, 2005).

En dicho estudio se determinó el fenotipado de la colinesterasa sérica mediante el test bioquímico de inhibición por dibucaína, fluoruro sódico y cloruro sódico y la determinación de la actividad de la colinesterasa sérica usando benzoilcolina como sustrato. Se seleccionaron todos los individuos con un fenotipo inusual, concretamente aquellos con fenotipo US con rango de actividad catalítica entre 450 y 650 U/l, UA, AK, UF, aquellos otros con actividad catalítica muy cercana al límite inferior de normalidad (650 U/l) que mostraron un perfil usual de inhibición por los compuestos anteriormente mencionados, y por último individuos de fenotipo AA y FF con una actividad catalítica inferior a 450 U/l. En la Tabla 14 del apartado de resultados se muestra el porcentaje de individuos de cada fenotipo.

Estos casos han sido sometidos a estudio genético-molecular para determinar las variantes genéticas que contienen el alelo A (atípico) y el alelo K (Kalow), que dan lugar a enzimas con menor actividad catalítica frente a los sustratos convencionales.

Recolección de muestras

A todos los sujetos del estudio previo se les extrajeron muestras de sangre para efectuar diversas determinaciones analíticas. Se recogieron alícuotas de 100 µl de sangre para depositarlas en una tarjeta FTA® (Cat. no. WB120205; Whatman International Ltd, Piscataway, NJ, USA), ver Figura 10. Todas las muestras se dejaron secar, se numeraron y fueron almacenadas a temperatura ambiente en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada, para posteriormente ser utilizadas para los diferentes análisis genéticos.

Extracción del ADN

En el momento de proceder a la extracción, las muestras archivadas en el laboratorio en papel FTA® tenían una antigüedad de 10 años desde que se depositó la sangre. A pesar de que el fabricante especifica que el ADN genómico puede estar almacenado en las tarjetas FTA® a temperatura ambiente durante más de 17 años, la purificación del ADN de la muestra se realizó mediante una modificación de los protocolos estandarizados (Whatman, Clifton, NJ, USA), aumentando el número de lavados, con el fin de asegurarse que el ADN genómico se encontrara totalmente limpio de restos celulares e inhibidores en el momento de la amplificación por PCR. En la Figura 11 se detalla el protocolo de extracción optimizado para las muestras de este estudio.

Este soporte facilita la extracción y purificación del ADN debido a que, cuando las células entran en contacto con él, lisa las membranas celulares, desnaturaliza las proteínas e inmoviliza los ácidos nucleicos. Además, elimina la necesidad de espacio en el congelador, mejora la accesibilidad de la muestra y reduce el espacio y los costes de almacenamiento.

Figura 10: Instrumental para extracción en papel FTA®

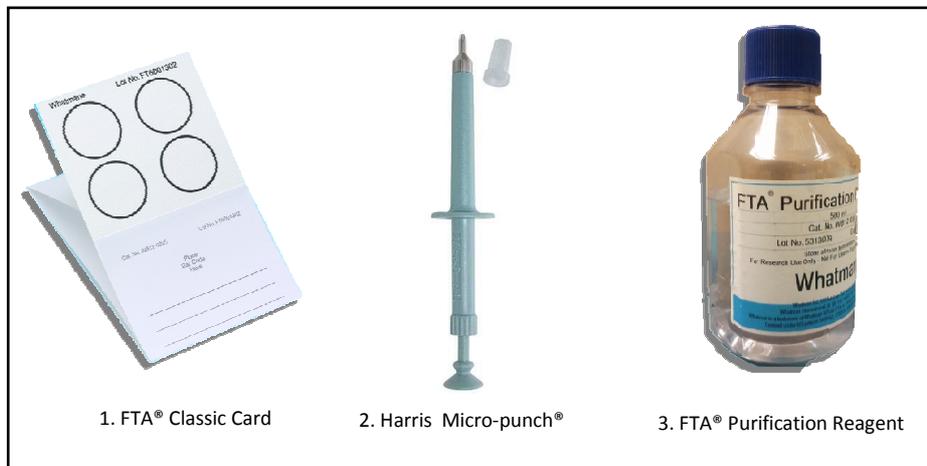
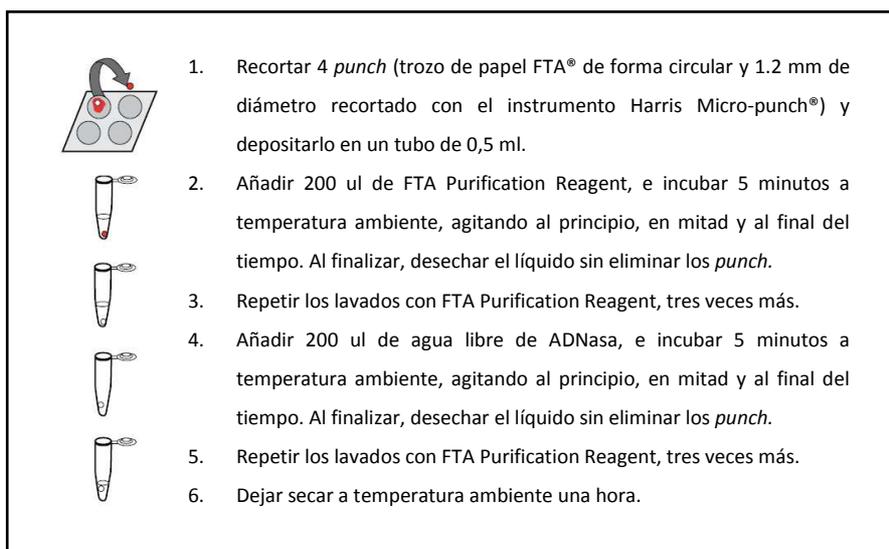


Figura 11: Protocolo modificado de extracción de ADN en FTA® para muestras con más de 10 años.



Ver protocolo original en <http://www.whatman.com/References/FTAforBloodDNA%20DataSheet%20FINAL%203.25.10%20LR.pdf>

Análisis genético molecular:

Para proceder al genotipado de las muestras en la variante atípica y la variante K se realizó una extensa búsqueda bibliográfica sobre los métodos usados por otros autores, y seleccionar así el que mejor se adapte a nuestras necesidades y capacidades, tanto económicas como instrumentales (Altamirano et al., 2000; Deniz-Naranjo et al., 2007; Gatke, Viby-Mogensen, & Bundgaard, 2002; Gatke, Viby-Mogensen, Ostergaard, & Bundgaard, 2005; Hohler, Hundt, Rittner, Schneider, & Meyer zum Buschenfelde, 1995; Howard et al., 2010; Jensen et al., 1996; Kim et al., 2001; Levano, Keller, Schobinger, Urwyler, & Girard, 2008; Mikami et al., 2008; Orita, Iwahana, Kanazawa, Hayashi, & Sekiya, 1989; Shibuta et al., 1994).

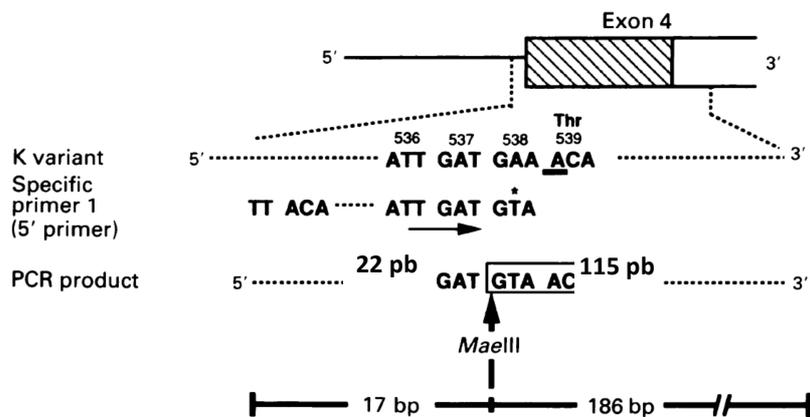
En la detección de ambos polimorfismos se usó la misma técnica, amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) y corte con enzimas de restricción y visualización en geles de agarosa. Sin embargo, la variante K, a diferencia de la variante atípica, no genera ni destruye ninguna diana de restricción, y por tanto es necesario generarlo con el método Amplification-Created Restriction Sites (ACRS).

Amplification-Created Restriction Sites (ACRS) en el caso de la variante K

Tras revisar en la literatura científica los diferentes métodos utilizados para detectar este polimorfismo, se ha diseñado el protocolo descrito en la presente memoria basado en Jensen et al (1996) y Kim et al (2001).

Como se ha mencionado antes, la mutación causante de la variante K no crea ni destruye ningún sitio de restricción. Por eso, en el protocolo se usan “primer” (es decir, cebadores) modificados adyacentes a la mutación, para introducir un sitio de restricción artificial en el alelo mutante o el normal. Mediante el programa informático MISMATCH (Haliassos et al., 1989) diseñaron una pareja de primer que genera un sitio de restricción MaeIII para la variante K (ver Figura 12).

Figura 12: Esquema corte MaeIII. (Shibuta et al., 1994)



Para detectar la variante K mediante el método ACRS se usó un cebador modificado en el extremo 3' (K-var1: 5'-ATATTTTACAGGAAATATTGATGTA-3') del nucleótido que está subrayado, cambiando una adenina por una timina (Tabla 4). Con este método se consigue generar un sitio de restricción para MaeIII en los fragmentos amplificados de los casos que sean portadores del alelo K. El cebador modificado K-var1 y el cebador normal AP8A (5'-ATTAGAGACCCACACAACCTT-3') producen un fragmento de 137 pb, que en presencia del alelo K es cortado por MaeIII, generando un fragmento de 22 pb y otro de 115 pb (Tabla 10).

Tabla 4: Cebadores de la variante K

Cebadores			
Modificación	Nombre	Secuencia	Nº nucleótidos
A/T, nt 24	K-var1	5'-ATATTTTACAGGAAATATTGATGTA-3'	25nt
No	AP8A	5'-ATTAGAGACCCACACAACCTT-3'	20nt

Amplificación por PCR:

Para poder detectar las zonas de estudio, hay que aumentar el número de copias de esos fragmentos, por lo que se realiza la reacción de la polimerasa en cadena o PCR (Mullis, 1990).

Para realizar esta técnica se tomó como ADN molde un punch de papel FTA (pequeño trozo de papel FTA, con forma circular y 1.2 mm de diámetro), gracias al instrumento Harris Micro-punch® (Figura 10).

Para la amplificación se utilizó el kit AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)¹, cuya Taq necesita estar un tiempo inicial a 95 °C para que sea activa. Esta característica se la conoce como *Hot Start*, mejorando la PCR a temperaturas elevadas debido a que evita la amplificación de productos inespecíficos. La master mix contiene todos los reactivos necesarios para la PCR, excepto los cebadores y la muestra, y se utilizó la concentración que especifica el fabricante (1X). En un volumen final de reacción de 25 µl, se añadieron los cebadores quedando a una concentración final de 0,5 µM cada uno (ver Tabla 5).

Tabla 5: Componentes de la PCR

Reactivos	Volumen de reacción	Concentración Final
Agua desionizada	Hasta completar V_T	---
Cebador 5' (10µM)	1,25 µl	0,5 µM
Cebador 3' (10µM)	1,25 µl	0,5 µM
Muestra	1 <i>punch</i>	1 <i>punch</i>
PCR Master Mix (2X)	12,5 µ	1X
Volumen Total (V_T)	25 µ	---

En el caso de la variante atípica, el tipo de amplificación por PCR no necesita tener cebadores modificados ya que es el propio alelo normal el que crea un sitio de corte para la enzima de restricción Sau3AI (isoesquizómero de la enzima MboI), generando un fragmento de 350 pb y otro de 47 pb (Tabla 9). Los cebadores utilizados en este caso han sido descritos por Jensen et al (1996). Los cebadores AP1A (5'-TGCTATATGCAGAAGGCTTAT-3') y 3'SPI (5'GTGTTTGGTTCCACATCTC-3') fueron diseñados para amplificar un fragmento de 397 pb (ver Tabla 6).

¹ Ver protocolo en http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041165.pdf

Tabla 6: Cebadores de la variante atípica

Modificación	Nombre	Cebadores	
		Secuencia	Nº nucleótidos
No	AP1A	5'-TGCTATATGCAGAAGGCTTAT-3'	21nt
No	3'SPI	5'-GTGTTGGGTTCCACATCTC-3'	20nt

Las condiciones de PCR se especifican en la Figura 13 y la Figura 14, utilizando un termociclador de la casa Biometra (T3 Thermocycler, ver Imagen 4). La diferencia entre las condiciones de las dos variantes solo está en la temperatura de anillamiento de los cebadores, siendo la más óptima para la variante K de 56 °C y para la variante atípica de 53 °C, tras realizar pruebas a diferentes temperaturas.

Imagen 4: Termociclador Biometra™. Cubeta y fuente de alimentación Bio Rad™



Además, se usan varios controles para controlar que todos los pasos, desde la extracción hasta la amplificación, sucedan de forma correcta. Por un lado, se extrae una muestra de sangre depositada en FTA con una antigüedad menor de 1 año para comprobar que la extracción no se ve alterada por el tiempo de toma de las muestras de estudio, llamada A1, la cual no está adscrita a ningún fenotipo. Por otro lado se usa una concentración conocida de ADN, K562 DNA High Molecular Weight (Promega), para añadirla en el paso de la amplificación por PCR. Ambos controles se utilizan siempre junto con las muestras en el momento de la PCR.

Figura 13: Condiciones de PCR de la variante K

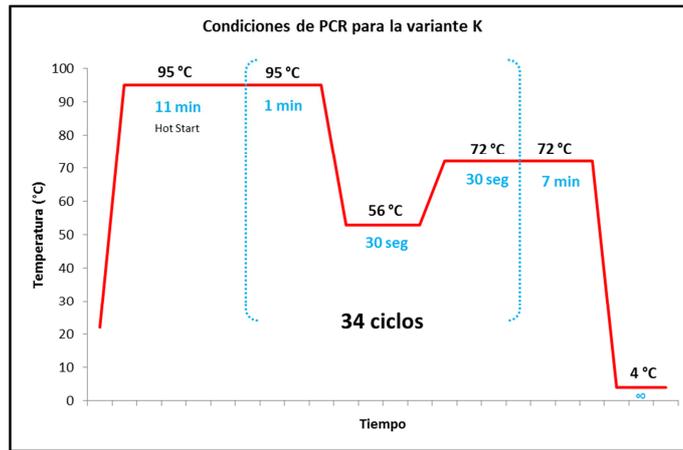
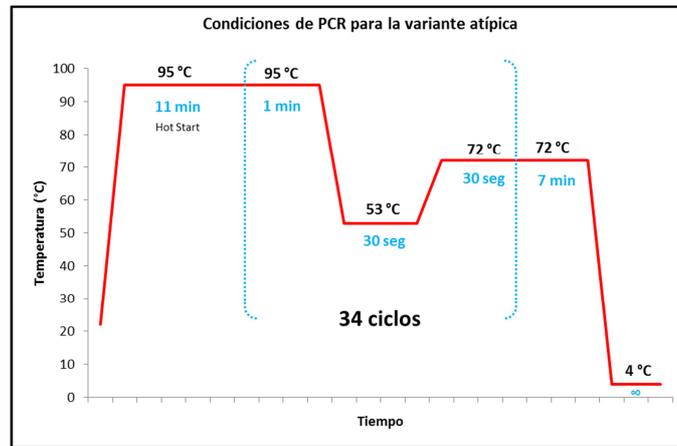


Figura 14: Condiciones de PCR de la variante atípica



Una vez finalizada la reacción de amplificación se evalúa la cantidad, calidad y tamaño de los productos de amplificación mediante electroforesis (100 v durante 30 minutos) en geles de agarosa al 2%, usando TBE (Buffer Tris-Borato- EDTA) como buffer amortiguador (Zavala-Castro, Acosta-Viana, Guzmán-Marín, González-Valera, & Jiménez-Delgadillo, 2005). Se usa una escalera de 100 a 1000 pb de tamaño (Ladder 1kb) que corre en la electroforesis al mismo tiempo que las muestras, para poder determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.

El reactivo utilizado para la tinción de los geles de agarosa fue GelRed™, en lugar de bromuro de etidio (BrEt), usado tradicionalmente. Las ventajas de este reactivo son que es muy estable en el tiempo, no es mutagénico ni citotóxico y seguro para el medio ambiente. Los geles se visualizaron con un transiluminador a 254 nm y se comprobó que las bandas se definen mejor con GelRed™ que con el bromuro de etidio.

Además, otro motivo para sustituir el BrEt por GelRed™ es de carácter técnico pues en el momento de la electroforesis el BrEt migra en sentido opuesto al del ADN, es decir hacia el

polo negativo. Esta situación provoca que, cuando el gel se mantiene en electroforesis más de 2 horas, en nuestro caso 4 horas, se vean las bandas de ADN muy poco definidas al no estar intercaladas con el reactivo. Otra opción fue realizar baños de los geles en BrEt, en vez de añadirlo al gel antes de la electroforesis, sin embargo los resultados no fueron los esperados ya que las bandas se observaban difusas.

Figura 15: Gel Agarosa al 2% con el fragmento amplificado de la variante atípica

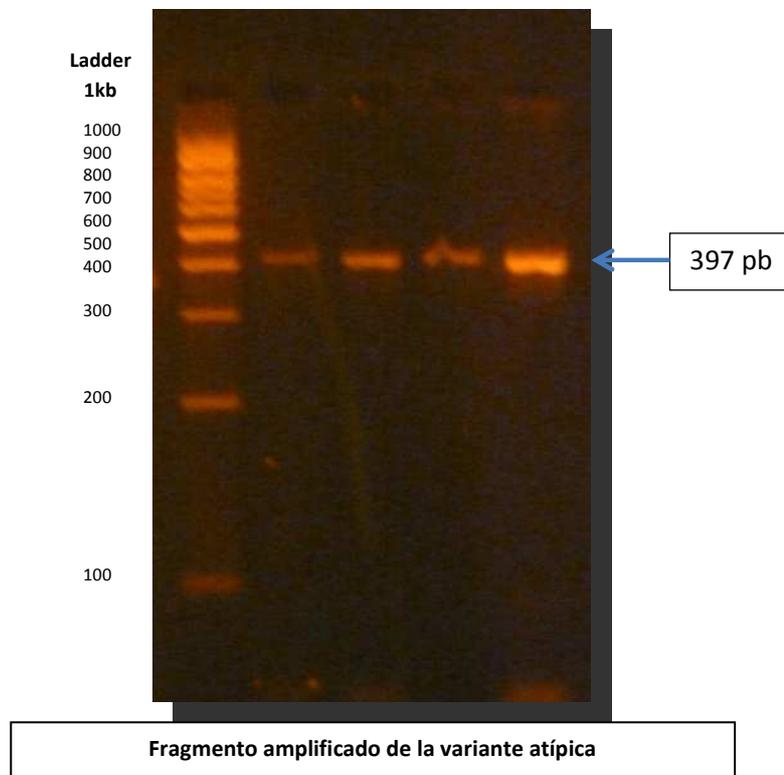
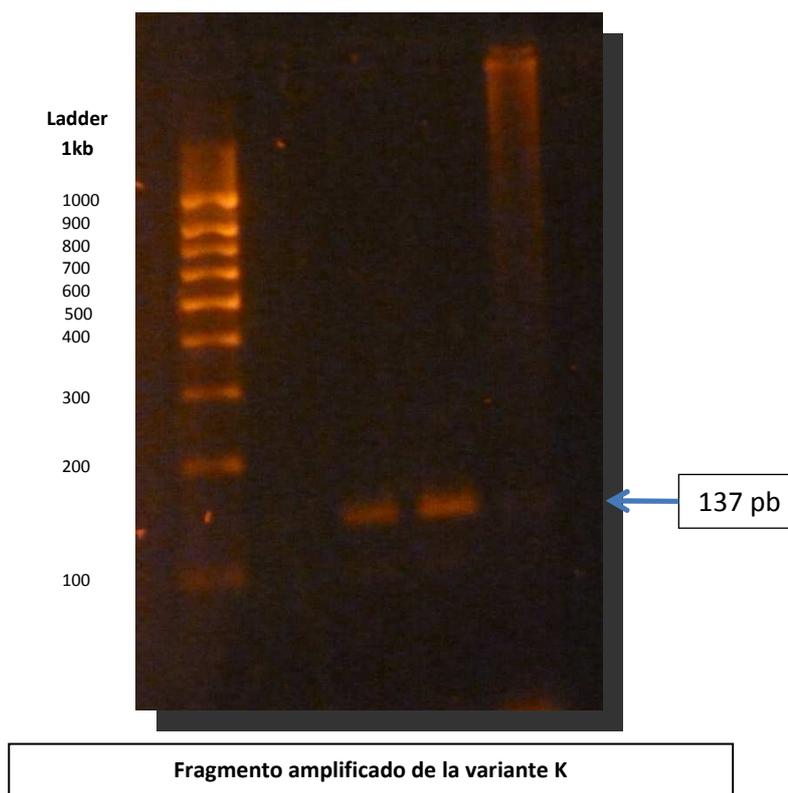


Figura 16: Gel Agarosa al 2% con el fragmento amplificado de la variante K



Digestión con enzimas de restricción

Tras comprobar que los fragmentos amplificados tenían las características que interesaban, se procedió a la digestión con enzimas de restricción. En ambos casos a 10 μ l del producto de PCR, se añade 1 unidad de enzima y el buffer recomendado, y por último se completaba hasta un volumen final de 20 μ l con agua desionizada. Se lleva a una temperatura de digestión a la cual funcionan de forma específica las dos enzimas de restricción durante dos 2h. En el caso de la Sau3AI, para genotipar la variante atípica, necesita estar a 37 °C (Tabla 7), mientras que MaeIII, usada para genotipar la variante K, necesita estar a 55 °C (Tabla 8). La peculiaridad de Sau3AI es que es necesario desactivarla subiendo la temperatura a 65 °C durante 20 min para que no siga actuando.

Las digestiones se pusieron a punto realizando diferentes pruebas con cantidades variables de enzima, así como usando tiempos de digestión descendientes, llegando hasta la cantidad y tiempo mínimo óptimo para el correcto genotipado de las muestras.

Tabla 7: Condiciones de la enzima de restricción para la variante atípica

ENZIMA DE RESTRICCIÓN – Variante atípica

Sau3AI ó MboI (+Buffer recomendado)					
Sitio de corte	u	PCR	Vf (ul)	Tª	Tiempo
-N GATC-	1	10	20	37 °C – 65 °C	2 h – 20'

Tabla 8: Condiciones de la enzima de restricción para la variante K

ENZIMA DE RESTRICCIÓN – Variante K MaeIII (+Buffer recomendado)					
Sitio de corte	u	PCR	Vf (ul)	Tª	Tiempo
-N GTNAC-	1	10	20	55 °C	12h

Tras realizar la digestión, los fragmentos de ADN son separados por electroforesis y se visualizan en geles de agarosa al 3,5%, teñidos con GelRed™ antes de su gelificación (ver pág. 31). Para ambas variantes genéticas se usan las mismas condiciones de electroforesis. Los primeros diez minutos de electroforesis se hace con un voltaje de 100 v, con objeto de que se integre el ADN en el entramado del gel de agarosa. Tras esto, se mantiene la electroforesis a 70 v durante 4 horas.

En este caso también se añade en uno de los pocillos del gel de agarosa una escalera de tamaños de 1kb (Ladder 1kb) para identificar correctamente cada polimorfismo. Lo idóneo es usar controles positivos en las digestiones con enzimas de restricción para cada una de las variantes genéticas, para comprobar que no se producen digestiones parciales. En este caso no se usaron inicialmente porque no se disponía de individuos con cada uno de los alelos. Sin embargo, en posteriores estudios que están ahora mismo en marcha se usará el protocolo de genotipado que se ha puesto a punto en el presente trabajo.

En las Tabla 9 y Tabla 10 se hace un resumen de los fragmentos esperados para los diferentes genotipos de la variante atípica y K. En la Figura 17 y la Figura 18 vemos las fotografías realizadas a los geles de agarosa de los productos de PCR digeridos con enzimas de restricción, tanto de la variante atípica como la variante K.

Tabla 9: Enzima de digestión Mbol para la variante atípica

	Normal	Variante Atípica
ADN	---GAT---	---GGT---
Diana de Mbol		--N GATC--
Corte	Sí	No
Producto	350 + 47 pb	397 pb

Tabla 10: Enzima de digestión MaeIII para la variante K. (Haliassos et al., 1989)

	Normal	Variante K
ADN	-----CGAAGC-----	-----GAAA* C-----
Cebadores	---GIA--3'	---GIA--3'
Producto de PCR	---GTAGC---	---GTAA* C---
Diana MaeIII	--GTNAC	↓GTNAC
Creado	Sitio MaeIII no creado	Sitio MaeIII creado
Tamaño del producto	137 pb	22 pb + 115 pb

Figura 17: Gel de agarosa al 3,5% corrido durante 4 h a 70v, de los fragmentos amplificados y digeridos de la variante atípica.

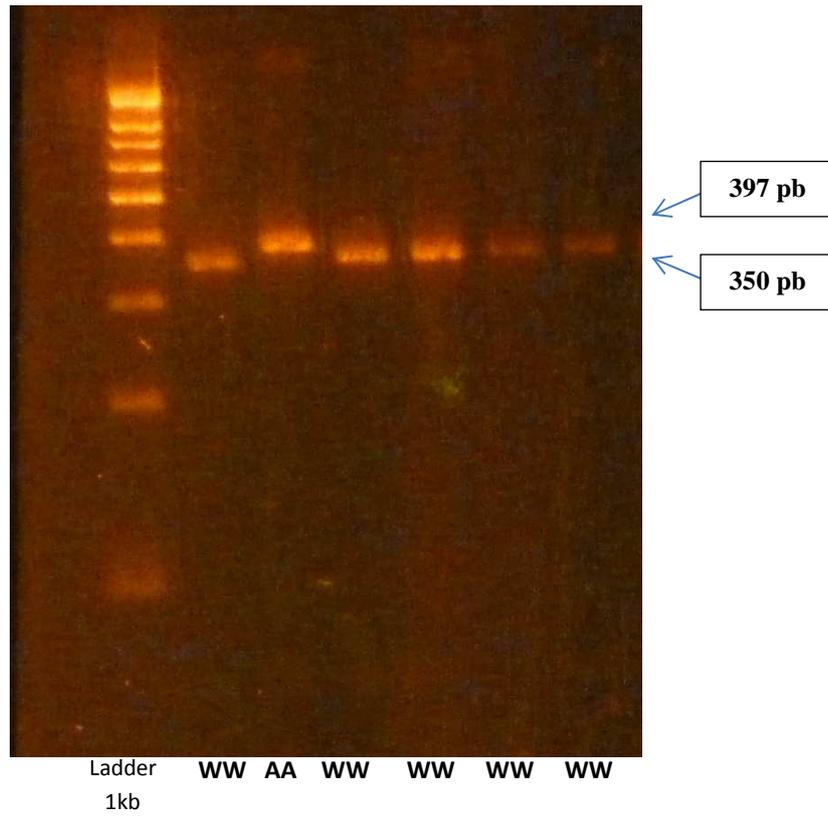
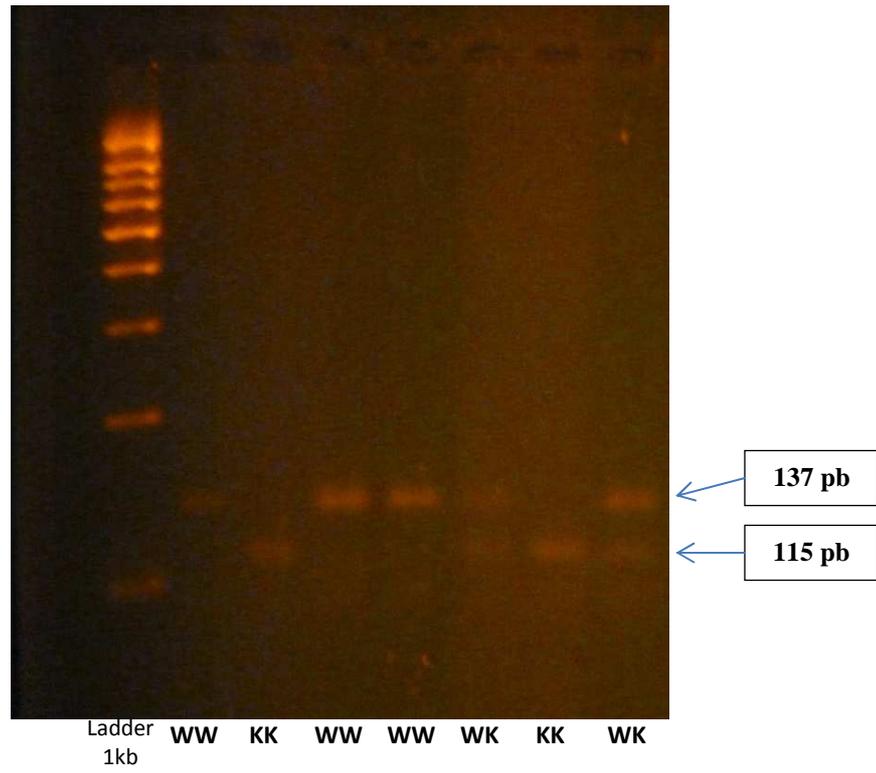


Figura 18: Gel de agarosa al 3,5% corrido durante 4 h a 70v, de los fragmentos amplificados y digeridos de la variante K.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 11 se muestran los resultados de las variantes genéticas de colinesterasa sérica, tanto la atípica (Asp70Gly) como la K (Ala530Thr) en las 32 muestras analizadas en este estudio. Se han incluido también los datos bioquímicos de la actividad colinesterasa sérica y los resultados de los test de inhibición por dibucaína, fluoruro sódico y cloruro sódico que, aunque fueron objeto de un trabajo realizado anteriormente (López Guarnido, 2005) se reproducen de nuevo aquí a efectos comparativos. Estos valores bioquímicos permiten adscribir un determinado fenotipo a cada individuo utilizando los datos presentados en la Tabla 2 que tienen en cuenta tanto la actividad colinesterasa sérica (utilizando benzoilcolina como sustrato) como los diferentes números de inhibición (calculados como porcentaje de actividad colinesterasa residual de cada muestra tras incubación con cada inhibidor) (Whittaker, 1984) (Turner, Hall, Whittaker, Holder, & Kricka, 1985).

Si se observan los rangos de actividad catalítica de cada uno de los fenotipos expresados en la Tabla 2, se aprecia un solapamiento considerable entre los fenotipos UU y el US, que presentan iguales números de inhibición pero diferente actividad catalítica. En este trabajo se ha adoptado el criterio de considerar que un determinado individuo presenta el fenotipo US cuando su actividad es menor de 650 U/l y la respuesta a los inhibidores. En los casos en que la actividad sea inferior a 450 U/l y presente similares números de inhibición, se considera que se trata de un fenotipo desconocido de baja actividad, cuya caracterización hubiera necesitado del uso de otros inhibidores no utilizados en este estudio por no haber sido asequibles en el comercio (Reiner, Simeon-Rudolf, & Skrinjaric-Spoljar, 1995). La tabla se ha completado con los rangos de valores para adscribir los fenotipos UK y AK (Jensen et al., 1996), teniendo en cuenta que, como se ha mencionado anteriormente, el fenotipo UK es muy difícil de diferenciar salvo que vaya acompañado del alelo A (fenotipo AK).

En la Tabla 14 y en la Figura 20 se muestra la distribución de los fenotipos séricos de colinesterasa en las muestras estudiadas. Se observa que el fenotipo más frecuentemente encontrado es el UF seguido del US o UK, con porcentajes del 50 y 20%, respectivamente.

Antes de entrar a describir los resultados obtenidos en el análisis genético y su discusión, es necesario aclarar varios puntos. El individuo control A1, descrito en la página 30, al no tener adscrito ningún fenotipo por falta de datos bioquímicos (ver última muestra de la Tabla 11), no se ha incluido en el análisis de los resultados. Del mismo modo, aunque el número de individuos seleccionado del estudio previo fue de 31, sólo se han considerado 30, ya que el

resultado del análisis genético de la variantes K en el individuo 405 no ha sido concluyente. En el análisis genético de la variante atípica de las muestras 202, 221 y 230 se produjo la misma situación; sin embargo, estos sí se han incluido en el análisis de los resultados ya que, como se detalla más adelante, se ha establecido la presunción de que los datos de fenotipo permiten inferir la presencia o ausencia del alelo A. Por tanto, en la Tabla 11, se observa que estas muestras presentan los fenotipos UF, US y US, UK. Esta hipótesis se ve reforzada, en el caso de las muestras 202 y 221 (ambas con genotipo usual o salvaje para la variante K), por nuestro estudio y por estudios anteriores (Bartels et al, 1992), en los que no se encuentran individuos portadores del alelo A con genotipo usual o salvaje para la variante K.

A partir del análisis genético de las dos variantes de BChE estudiadas, se observa que, los portadores del alelo K se encuentran en mayor proporción (56,67%) que los del alelo A (13,33%). (Ver Tabla 12 y Figura 19). Estos resultados confirman los datos de frecuencias alélicas encontrados en la literatura y que se exponen en la Tabla 3.

En la Figura 21 y Tabla 16 se muestran los resultados según el haplotipo formado por las dos variantes genéticas estudiadas. El haplotipo mayoritario ha sido W/W con el 44%, seguido de W/K con 30% y K/K con 14%; los demás no superan el 3%, a excepción de W/A y A/A que no se encuentran representados. Con este último dato se puede estimar que la presencia del alelo K en el haplotipo, no implica necesariamente ser portador del alelo A, sin embargo, en el caso contrario sí es así. Según Bartels et al (1992) la variante K está en desequilibrio de ligamiento con respecto al punto de mutación responsable de la variante atípica en el 89% de sus portadores, lo que parece justificar nuestra hipótesis.

En la Tabla 15 se expresan los resultados de concordancia entre fenotipo y genotipo de la colinesterasa sérica, donde se muestra una clara identificación del alelo A mediante fenotipado en todos los individuos con un haplotipo portador de este alelo, llegando incluso a discriminar los individuos heterocigotos de los homocigotos. Sin embargo, solo se detectan tres haplotipos portadores del alelo K de los trece en total que no están acompañados por el alelo A.

Tabla 11. Datos de fenotipado y genotipado de cada una de las muestras estudiadas.

Ref.	Actividad BChE (U/l)	DN	FN	NC	Fenotipo ¹	Aminoácido 70	Aminoácido 539	Genotipo
15	668,39	79	58	12	UU	Asp/Asp	Thr/Thr	K/K
27	916,08	84	42	22	UF	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
31	597,87	89	63	13	US	Asp/Asp	Thr/Thr	K/K
44	849,04	77	54	32	UF	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
57	636,22	59	46	28	UA, AK	Asp/Gly	Thr/Thr	K/AK
59	647,58	81	62	28	US, UK	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
202	699,95	78	53	12	UF	- [°]	Ala/Ala	W/W*
221	628,85	82	74	20	US	- [°]	Ala/Ala	W/W*
232	565,7	80	57	12	US, UK	- [°]	Thr/Thr	K/K*
236	639,24	79	59	17	US, UK	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
241	852,75	66	51	25	UA	Asp/Gly	Ala/Thr	W/AK
246	362,32	71	27	-	FF	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
255	422,12	19	25	56	AA	Gly/Gly	Thr/Thr	AK/AK
256	631,58	80	60	28	US, UK	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
258	559,94	78	62	22	US, UK	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
302	1121,98	83	46	21	UF	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
307	964,21	80	52	23	UF	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
314	1157,58	80	51	22	UF	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
316	517,42	80	55	21	US, UK	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
317	665,16	82	57	20	UU	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
321	1117,63	82	49	15	UF	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
325	630,34	82	50	17	UF	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
326	1023,67	80	53	18	UF	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
343	1051,22	79	52	49	UF	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
345	1108,79	78	44	23	UF	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
349	879,98	80	45	21	UF	Asp/Asp	Ala/Ala	W/W
354	982,52	79	49	16	UF	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
357	804,75	79	51	20	UF	Asp/Asp	Thr/Thr	K/K
360	772,48	81	49	18	UF	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K
405	621,15	79	54	15	UF	Asp/Asp	- [°]	?W/?W ²
407	292,65	20	100	53	AA	Gly/Gly	Ala/Thr	A/AK
A1 ⁺	-	-	-	-	-	Asp/Asp	Ala/Thr	W/K

¹ Adscrito según Whittaker et al (1984) y Jensen (1996).² No se ha podido estimar el genotipo de la muestra 405 en la variante K, por tanto se elimina del análisis de los resultados.

* Estimación del genotipo gracias al alto grado de desequilibrio de ligamiento del alelo A con el alelo K.

ψ En las muestras 202, 221, 232 y 405 no fue posible genotiparlos por falta de enzima de restricción.

+ Debido a la ausencia de datos fenotípicos se elimina de análisis de los resultados.

Tabla 12: Frecuencias alélicas de los sujetos de estudio

	Alelo K			Alelo A		
	WW	WK	KK	WW	WA	AA
N	13	11	6	26	2	2
%	43,33%	36,67%	20%	86,67%	6,67%	6,67%
Frecuencias alélicas	56,67%			13,33%		

Tabla 13: Frecuencias haplotípicas de los sujetos de estudio

		A					
		W _A W _A		W _A A		AA	
		N	%	N	%	N	%
K	W _K W _K	13	43,33%	0	0%	0	0%
	W _K K	9	30%	1	3,33%	1	3,33%
	KK	4	13,33%	1	3,33%	1	3,33%

Figura 19: Distribución de los alelos K y A en las muestras estudiadas

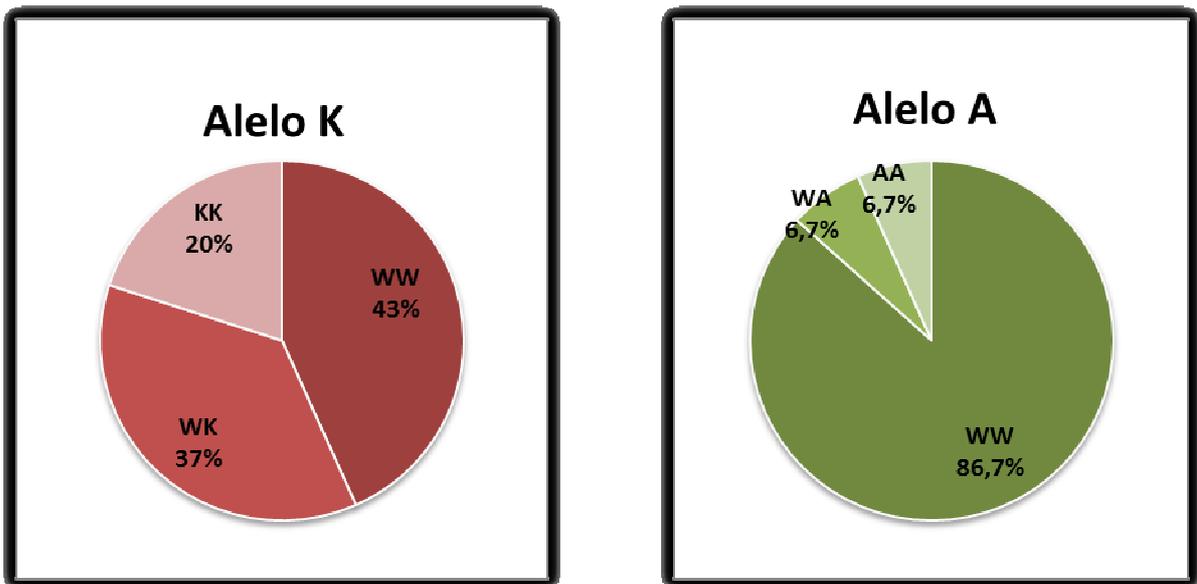


Tabla 14. Distribución de fenotipos séricos de colinesterasa en las muestras estudiadas.

Criterios de selección	Fenotipo	Frecuencias	
		N	%
~ 650 U/l	UU	2	6,67%
NF 46-54	UF	15	50,00%
455-650 U/l	US	2	6,67%
	US, UK	6	20,00%
NC 19-35	UA, AK	1	3,33%
	UA	1	3,33%
<455 U/l	AA	2	6,67%
	FF	1	3,33%
Total		30	100%

Figura 20: Distribución de fenotipos séricos de colinesterasa en las muestras estudiadas.

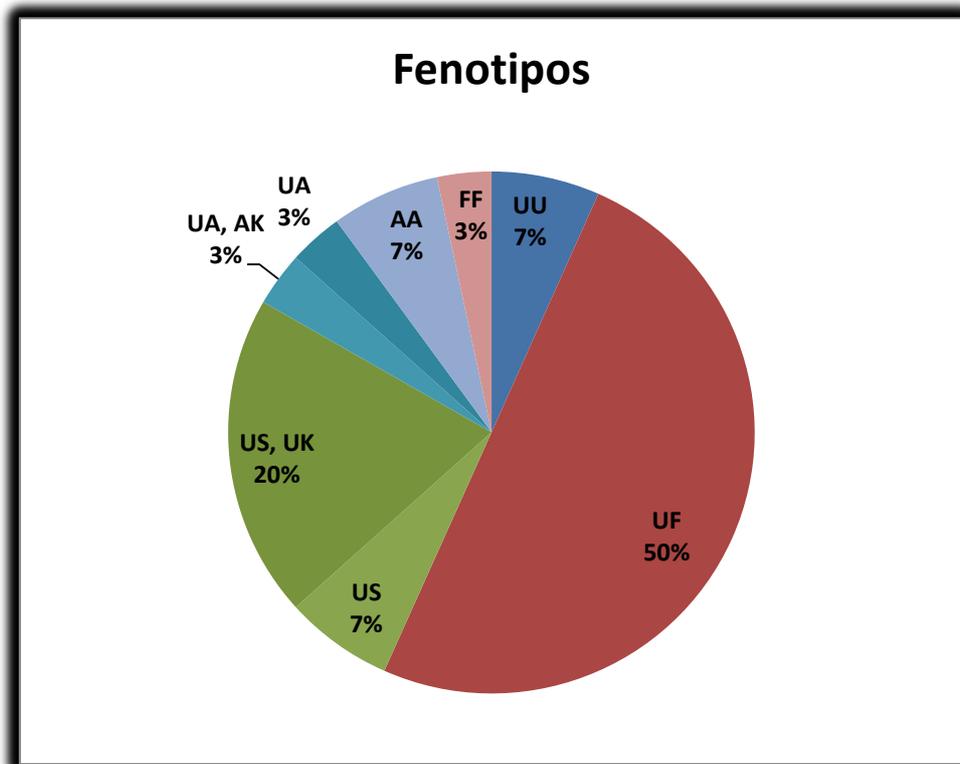


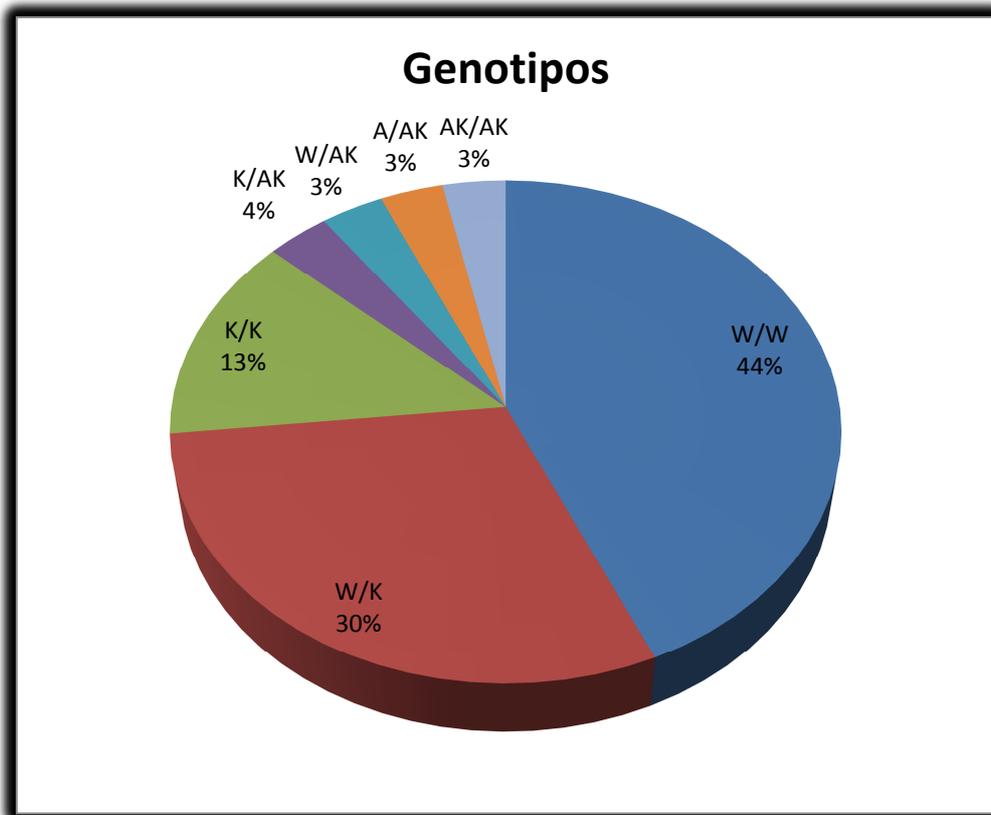
Tabla 15: Concordancia entre Fenotipo y Genotipo en las muestras analizadas

Fenotipos	Genotipos Posibles						Total N
	N	Haplotipo	N	Haplotipo	N	Haplotipo	
UU	1	W/W	1	K/K			2
UF	8	W/W	1	K/K	6	W/K	15
US	1	W/W	1	K/K			2
US, UK	3	W/W	1	K/K	2	W/K	6
UA, AK	1	K/AK					1
UA	1	W/AK					1
AA	1	A/AK	1	AK/AK			2
FF	1	W/K					1

Tabla 16: Genotipos de las variantes genéticas, atípica y K

Fenotipos	Haplotipos										Total	
	W/W	W/K	K/K	K/AK	W/AK	A/AK	AK/AK	W/A	A/A	N	%	
UU	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	6,67%	
UF	8	6	1	0	0	0	0	0	0	15	50%	
US	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2	6,67%	
US, UK	3	2	1	0	0	0	0	0	0	6	20,00%	
UA, AK	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	3,33%	
UA	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3,33%	
AA	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	6,67%	
FF	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3,33%	
Total	N	13	9	4	1	1	1	1	0	0	30	
	%	43,33%	30,00%	13,33%	3,33%	3,33%	3,33%	3,33%	0%	0%		100%

Figura 21: Distribución de los genotipos de colinesterasa en las muestras estudiadas.



CONCLUSIONES

El método usado para la adscripción del fenotipo atípico es fiable, ya que reconoce tanto a los individuos heterocigotos como los homocigotos para el alelo A. Sin embargo no sucede lo mismo en la variante K, quedando muchos individuos portadores de dicho fenotipo sin detectar y que pueden ser perfectamente caracterizados desde el punto de vista genético con el método desarrollado.

Para que los laboratorios clínicos realicen un estudio completo sobre susceptibilidad a tóxicos inhibidores de la colinesterasa, es necesario que, además de usar el método estándar para detectar el fenotipo de BChE en suero, incorporen a sus protocolos de rutina un método de análisis genético, como el propuesto en este trabajo, para determinar el genotipo de la variante K. Este análisis genético sería necesario principalmente en individuos con fenotipo atípico de BChE, ya que la susceptibilidad a este tipo de tóxicos aumenta si está acompañado de la variante K en homocigosis.

Si a todos estos factores le añadimos que la variante K no solo es la más frecuente entre las variantes de BChE, sino que es uno de los polimorfismos enzimáticos más usuales (La Du et al., 1990) y que menos se conoce su función metabólica, podemos concluir que es necesario profundizar en esta línea de investigación para detectar mejores biomarcadores genéticos de susceptibilidad a tóxicos anticolinesterásicos y desarrollar nuevos métodos de diagnóstico molecular.

REFERENCIAS

- Alfredo Tolón, B., & Xavier Lastra, B. (2010). La agricultura intensiva del poniente almeriense. Diagnóstico e instrumentos de gestión ambiental. *M+A. Revista Electrónica de Medioambiente*, 8 Retrieved from <http://revistas.ucm.es/index.php/MARE/article/view/MARE1010120018A/15042>
- Allderdice, P. W., Gardner, H. A. R., Galutira, D., Lockridge, O., Ladu, B. N., & McAlpine, P. J. (1991). The cloned butyrylcholinesterase (BCHE) gene maps to a single chromosome site, 3q26 *Genomics*, 11(2), 452-454. doi:10.1016/0888-7543(91)90154-7
- Altamirano, C. V., Bartels, C. F., & Lockridge, O. (2000). The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 869-877. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.740869.x
- Arpagaus, M., Kott, M., Vatsis, K. P., Bartels, C. F., La Du, B. N., & Lockridge, O. (1990). Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. evidence for a single copy. *Biochemistry*, 29(1), 124-131.
- Aznar-Sánchez, J. A., & Sánchez-Picón, A. (2010). Innovación y distrito en torno a un 'milagro': la configuración del sistema productivo local de la agricultura intensiva en Almería. *Revista de Historia Industrial*, 42(1), 157-193.
- Bartels, C. F., Jensen, F. S., Lockridge, O., van der Spek, A. F., Rubinstein, H. M., Lubrano, T., & La Du, B. N. (1992). DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *American Journal of Human Genetics*, 50(5), 1086-1103.
- Catano, H. C., Carranza, E., Huamani, C., & Hernandez, A. F. (2008). Plasma cholinesterase levels and health symptoms in peruvian farm workers exposed to organophosphate pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55(1), 153-159. doi:10.1007/s00244-007-9095-0
- Costa, L. G., & Eaton, D. L. (2006). *Gene-environment interactions :Fundamentals of ecogenetics*. Hoboken, N.J.: John Wiley.
- Deniz-Naranjo, M. C., Muñoz-Fernandez, C., Alemany-Rodríguez, M. J., del Carmen Perez-Vieitez, M., Aladro-Benito, Y., Irurita-Latasa, J., & Sanchez-Garcia, F. (2007). Butyrylcholinesterase, ApoE and

- alzheimer's disease in a population from the canary islands (spain). *Neuroscience Letters*, 427(1), 34-38. doi:10.1016/j.neulet.2007.08.059
- Furlong, C. E. (2007). Genetic variability in the cytochrome P450-paraoxonase 1 (PON1) pathway for detoxication of organophosphorus compounds. *J Biochem Mol Toxicol*, 21(4), 197-205.
- Garry, P. J., Dietz, A. A., Lubrano, T., Ford, P. C., James, K., & Rubinstein, H. M. (1976). New allele at cholinesterase locus 1 *Journal of Medical Genetics*, 13(1), 38-42.
- Gatke, M. R., Viby-Mogensen, J., & Bundgaard, J. R. (2002). Rapid simultaneous genotyping of the frequent butyrylcholinesterase variants Asp70Gly and Ala539Thr with fluorescent hybridization probes. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62(5), 375-383.
- Gatke, M. R., Viby-Mogensen, J., Ostergaard, D., & Bundgaard, J. R. (2005). Response to mivacurium in patients carrying the k variant in the butyrylcholinesterase gene. *Anesthesiology*, 102(3), 503-508.
- Haliassos, A., Chomel, J. C., Tesson, L., Baudis, M., Kruh, J., Kaplan, J. C., & Kitzis, A. (1989). Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. *Nucleic Acids Research*, 17(9), 3606.
- Harris, H., & Whittaker, M. (1961). Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: Recognition of two new phenotypes. *Nature*, 191, 496-498.
- Hernandez, A., Gomez, M. A., Pena, G., Gil, F., Rodrigo, L., Villanueva, E., & Pla, A. (2004). Effect of long-term exposure to pesticides on plasma esterases from plastic greenhouse workers *Journal of Toxicology and Environmental Health.Part A*, 67(14), 1095-1108. doi:10.1080/15287390490452371
- Hernandez, A. F., Amparo Gomez, M., Perez, V., Garcia-Lario, J. V., Pena, G., Gil, F., Pla, A. (2006). Influence of exposure to pesticides on serum components and enzyme activities of cytotoxicity among intensive agriculture farmers. *Environmental Research*, 102(1), 70-76. doi:10.1016/j.envres.2006.03.002
- Hernandez, A. F., Casado, I., Pena, G., Gil, F., Villanueva, E., & Pla, A. (2008). Low level of exposure to pesticides leads to lung dysfunction in occupationally exposed subjects. *Inhalation Toxicology*, 20(9), 839-849. doi:10.1080/08958370801905524
- Hernandez, A. F., Lopez, O., Rodrigo, L., Gil, F., Pena, G., Serrano, J. L., Pla, A. (2005). Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides: Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicology Letters*, 159(1), 13-21. doi:10.1016/j.toxlet.2005.04.008

- Hernandez, A. F., Mackness, B., Rodrigo, L., Lopez, 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), 565-574.
- Hernandez, A. F., Parron, T., Serrano, J. L., & Marin, P. (2010). *Epidemiological studies: Spain. in "anticholinesterase pesticides: Metabolism, neurotoxicity and epidemiology"* (Satoh,T.;Gupta,RC, ed.)
- Hernandez, A. F., Pla, A., Gomez, M. A., Pena, G., Gil, F., Pino, G., & Rodrigo, L. (2000). Susceptibilidad a los insecticidas organofosforados en trabajadores de invernadero: importancia de los marcadores bioquímicos. *Actas del III Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica*, , 369-377.
- Hohler, T., Hundt, M., Rittner, C., Schneider, P. M., & Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1995). Cholinesterase variants: Rapid characterisation by PCR/SSCP and evidence for molecular homogeneity. *Journal of Medical Genetics*, 32(2), 109-112.
- Howard, T. D., Hsu, F. C., Grzywacz, J. G., Chen, H., Quandt, S. A., Vallejos, Q. M., Arcury, T. A. (2010). Evaluation of candidate genes for cholinesterase activity in farmworkers exposed to organophosphorous pesticides - association of SNPs in BCHE. *Environmental Health Perspectives*, doi:10.1289/ehp.0901764
- Jensen, F. S., Nielsen, L. R., & Schwartz, M. (1996). Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. *Human Heredity*, 46(1), 26-31.
- Jensen, F. S., Skovgaard, L. T., & Viby-Mogensen, J. (1995). Identification of human plasma cholinesterase variants in 6,688 individuals using biochemical analysis *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 39(2), 157-162.
- Jiménez Díaz, J. F. (2008). *Estudio de caso del poniente almeriense. glocalización de la horticultura*
- Jiménez Guerrero, J. F. (2010). *Informe Económico Provincial: ALMERÍA EN CIFRAS 2009* (Cámara Oficial de Comercio, Industria y Navegación de Almería ed.)
- K.Silbergeld, E. (2001). TOXICOLOGIA. In *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo* (3ª ed., pp. 32.1-33.83) Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.
- Kalow, W., & Lindsay, H. A. (1955). A comparison of optical and manometric methods for the assay of human serum cholinesterase. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 33(4), 568-574.

- Kalow, W., & Staron, N. (1957). On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 35(12), 1305-1320.
- Kim, K. W., Jhoo, J. H., Lee, J. H., Lee, K. U., Lee, D. Y., Youn, J. C., Woo, J. I. (2001). Neither the butyrylcholinesterase K variant nor transferrin C2 variant confers a risk for alzheimer's disease in koreans. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 108(10), 1159-1166.
- La Du, B. N., Bartels, C. F., Nogueira, C. P., Arpagaus, M., & Lockridge, O. (1991). Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 11(1), 79-89.
- La Du, B. N., Bartels, C. F., Nogueira, C. P., Hajra, A., Lightstone, H., Van der Spek, A., & Lockridge, O. (1990). Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clinical Biochemistry*, 23(5), 423-431.
- Levano, S., Keller, D., Schobinger, E., Urwyler, A., & Girard, T. (2008). Rapid and accurate detection of atypical- and kalow-variants in the butyrylcholinesterase gene using denaturing high-performance liquid chromatography. *Anesthesia and Analgesia*, 106(1), 147-151. doi:10.1213/01.ane.0000296455.31211.bd
- Lewalter, J., & Leng, G. (1999). Consideration of individual susceptibility in adverse pesticide effects. *Toxicol Lett*, 107(1-3), 131-144.
- Lockridge, O., & Masson, P. (2000). Pesticides and susceptible populations: People with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk. *Neurotoxicology*, 21(1-2), 113-126.
- López Guarnido, 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.
- Manzano-Aglugliaro, F. (2007). Gasification of greenhouse residues for obtaining electrical energy in the south of spain: localization by gis. *INCI*, 32(2), 131-136.
- McGuire, M. C., Nogueira, C. P., Bartels, C. F., Lightstone, H., Hajra, A., Van der Spek, A. F., La Du, B. N. (1989). Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(3), 953-957.

- Mikami, L. R., Wieseler, S., Souza, R. L., Schopfer, L. M., Nachon, F., Lockridge, O., & Chautard-Freire-Maia, E. A. (2008). Five new naturally occurring mutations of the BCHE gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. *Pharmacogenetics and Genomics*, *18*(3), 213-218. doi:10.1097/FPC.0b013e3282f5107e
- Mollerup, H. M., & Gatke, M. R. (2011). Butyrylcholinesterase gene mutations in patients with prolonged apnea after succinylcholine for electroconvulsive therapy. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *55*(1), 82-86. doi:10.1111/j.1399-6576.2010.02316.x; 10.1111/j.1399-6576.2010.02316.x
- Mullis, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales De Biologie Clinique*, *48*(8), 579-582.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., & Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(8), 2766-2770.
- Parron, T., Hernandez, A. F., & Villanueva, E. (1996). Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. *Forensic Science International*, *79*(1), 53-63.
- Podoly, E., Shalev, D. E., Shenhar-Tsarfaty, S., Bennett, E. R., Assayag, E. B., Wilgus, H., Soreq, H. (2009). The butyrylcholinesterase K variant confers structurally derived risks for Alzheimer pathology. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(25), 17170-17179. doi:10.1074/jbc.M109.004952
- Reiner, E., Simeon-Rudolf, V., & Skrinjaric-Spoljar, M. (1995). Catalytic properties and distribution profiles of paraoxonase and cholinesterase phenotypes in human sera. *Toxicology Letters*, *82-83*, 447-452.
- Rubinstein, H. M., Dietz, A. A., & Lubrano, T. (1978). E1k, another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *Journal of Medical Genetics*, *15*(1), 27-29.
- Shibuta, K., Abe, M., & Suzuki, T. (1994). A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). *Journal of Medical Genetics*, *31*(7), 576-579.
- Turner, J. M., Hall, R. A., Whittaker, M., Holder, R. L., & Kricka, L. J. (1985). Application of stepwise discriminant analysis in the phenotyping of plasma cholinesterase variants. *Annals of Clinical Biochemistry*, *22* (Pt 2)(Pt 2), 175-178.

- Usmani, K. A., Hodgson, E., & Rose, R. L. (2004). In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse, and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone, and estradiol. *Chemico-Biological Interactions*, 150(3), 221-232. doi:10.1016/j.cbi.2004.09.015
- Viby-Mogensen, J. (1983). Cholinesterase and succinylcholine. *Danish Medical Bulletin*, 30(3), 129-150.
- Whittaker, M. (1984). Cholinesterases. In *Methods of enzymatic analysis* (pp. 52-74) Weinheim: Verlag Chemie.
- Whittaker, M. (1986). Cholinesterase. In L. Beckman (Ed.), *Monographs in human genetics* (11th ed.,). Basel: Karger.
- Whittaker, M., & Britten, J. J. (1985). Plasma cholinesterase variants. family studies of the E1k gene *Human Heredity*, 35(6), 364-368.
- Whittaker, M., & Britten, J. J. (1987). E1h, a new allele at cholinesterase locus 1 *Human Heredity*, 37(1), 54-58.
- WHO. (1990). Working group on the health impact of human exposure to recreational. *WHO Library*,
- Zavala-Castro, J., Acosta-Viana, K., Guzmán-Marín, E., González-Valera, N., & Jiménez-Delgadillo, B. (2005). *Manual de Técnicas Básicas en Biología Molecular* (1ª ed.) Universidad Autónoma de Yucatán.

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS MÁS CONOCIDAS DE BCHÉ.....	16
TABLA 2: METODOLOGÍA PARA LA ADSCRIPCIÓN DEL FENOTIPO SÉRICO DE COLINESTERASA EN CADA MUESTRA.	17
TABLA 3. RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS DE ESTUDIO	22
TABLA 4: CEBADORES DE LA VARIANTE K.....	28
TABLA 5: COMPONENTES DE LA PCR.....	29
TABLA 6: CEBADORES DE LA VARIANTE ATÍPICA.....	30
TABLA 7: CONDICIONES DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN PARA LA VARIANTE ATÍPICA	33
TABLA 8: CONDICIONES DE LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN PARA LA VARIANTE K	34
TABLA 9: ENZIMA DE DIGESTIÓN MBOI PARA LA VARIANTE ATÍPICA	35
TABLA 10: ENZIMA DE DIGESTIÓN MAEIII PARA LA VARIANTE K. (HALIASSOS ET AL., 1989)	35
TABLA 11. DATOS DE FENOTIPADO Y GENOTIPADO DE CADA UNA DE LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.	40
TABLA 12: FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.....	41
TABLA 13: FRECUENCIAS HAPLOTÍPICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO.....	41
TABLA 14. DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS SÉRICOS DE COLINESTERASA EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.....	42
TABLA 15: CONCORDANCIA ENTRE FENOTIPO Y GENOTIPO EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS	43
TABLA 16: GENOTIPOS DE LAS VARIANTES GENÉTICAS, ATÍPICA Y K	43